

OCENA

pracy doktorskiej mgr Marty Kuli

pt. „**Badania składu chemicznego z oceną aktywności biologicznej niektórych gatunków z rodzaju *Rubus* i *Lonicera*”**”

przedstawiona Radzie Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Pragnę na wstępie podziękować Radzie Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za powierzenie mi zaszczytu recenzowania pracy doktorskiej mgr Marty Kuli pt: „**Badania składu chemicznego z oceną aktywności biologicznej niektórych gatunków z rodzaju *Rubus* i *Lonicera*”**” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Mirosławy Krauze-Baranowskiej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje badania nad kompozycją chemiczną i właściwościami biologicznymi oraz farmakologicznymi surowców medycyny tradycyjnej stosowanych w przeziębieniu - owoców i pędów otrzymywanych z dwóch gatunków z rodzaju *Rubus* - *Rubus idaeus* (malina właściwa) i *Rubus occidentalis* (malina czarna) (Rosaceae) oraz owoców i kwiatów z gatunku *Lonicera caerulea var. edulis* (wiciokrzew siny) (Caprifoliaceae).

W ostatnich latach, szczególnie owoce maliny są przedmiotem wielu prac naukowych, potwierdzających ich cenne dla zdrowia właściwości antyoksydacyjne oraz przeciwzapalne i przeciwdrobnoustrojowe. Ponadto przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, badania nad pędami malin dostarczyły wartościowych danych uzasadniających ich tradycyjne zastosowanie we wschodnich rejonach Polski oraz Litwy i Białorusi.

Przedstawiona do oceny praca doktorska rozszerza wiedzę o związkach czynnych surowców leczniczych, pozyskiwanych z niektórych odmian uprawowych maliny właściwej i maliny zachodniej oraz wnosi nowe cenne informacje o składzie chemicznym owoców i kwiatów odmian krajowych wiciokrzewu sinego.

Przeprowadzone przez Doktorantkę eksperymenty obejmowały analizę fitochemiczną zebranego materiału roślinnego oraz badania aktywności biologicznej i farmakologicznej otrzymanych z niego ekstraktów roślinnych.

W ramach rozprawy dla celów badań fitochemicznych - jakościowych i ilościowych Doktorantka opracowała szereg systemów chromatograficznych, w tym systemów dwuwymiarowej chromatografii ciekowej (2D LC) z użyciem technik *comprehensive* i *heart-cutting off-line/on-line*, w sprzężeniu z detektorami MS (ESI-MS, APCI-MS, DUIS) oraz DAD. Badania z zakresu systemów 2D LC stanowią o wysokiej wartości pracy i są znaczącym elementem jej nowości.

Opracowanymi metodami LC (zarówno 1D jak i 2D LC) Doktorantka analizowała w toku prac szereg grup metabolitów wtórnych obecnych w powyższych matrycach roślinnych w tym:

- zespołów związków czynnych z pędów maliny właściwej, stanowiących elagotaniny, pochodne kwasu elagowego, kwasu metyloelagowego, fenolokwasy, flawonoidy oraz

- zespołów związków czynnych z kwiatów wiciokrzewu siniego – fenolokwasów, flawonoidów, irydoidów

- zespołów związków czynnych z owoców wiciokrzewu – kwasów fenolowych, pochodnych mono- i dimerycznych flawan-3-olu oraz flawonoidów i antocyjanów

- zespołów związków czynnych z owoców malin – flawonoidów, prostych fenoli, flawan-3-oli.

Doktorantka w systemach 2D LC umiejętnie łącząc fazy stacjonarne będące modyfikowanymi chemicznie żelami krzemionkowymi typu C-18 i zawierającymi reszty pentafluorofenyłowe generowała ortogonalność systemów 2D LC. Równocześnie stosując różne programy elucji gradientowej w obydwu wymiarach (¹D i ²D) osiągnęła w opracowanych systemach wyższe wartości parametru pojemności względem pików (*P*). Należy podkreślić, że niewątpliwym sukcesem Doktorantki jest rozpoznanie z użyciem opracowanego systemu 2D LC „*heart-cutting*” *off-line/on-line* składu chemicznego kwiatów badanych krajowych odmian uprawowych wiciokrzewów oraz kompozycji związków czynnych z pędów malin z użyciem opracowanego systemu 2D LC „*comprehensive*”. Ta część rozprawy doktorskiej wymagała od Autorki bardzo dobrej znajomości podstaw techniki wysokosprawnej chromatografii ciekowej, nie tylko w zakresie doboru parametrów separacji - faz ruchomych, profili elucji ale również odpowiedniej selekcji kolumn chromatograficznych. Do osiągnięć Doktorantki należy również opracowanie warunków separacji 1D HPLC-DAD-ESI/APCI-MS związków irydoidowych w owocach 3 odmian krajowych wiciokrzewu siniego. W oparciu o dane widm UV i MS doktorantka zidentyfikowała w owocach *L. coerulea* m. in .loganinę, kwas loganowy i swerozyd oraz

ujawniła w obrębie badanych odmian kultywarowych różnice ilościowe w zawartości poszczególnych irydoidów. Uwzględniając dane literaturowe o właściwościach przeciwzapalnych identyfikowanych irydoidów (loganiny, kwasu loganowego), wskazała że mogą one włączać się w efekt przeciwzapalny owoców, obok związków antocyjanowych

Przedstawiona rozprawa jest wartościowym osiągnięciem w zakresie chemotaksonomii rodzaju *Lonicera*. Doktorantka walidując opracowaną metodę 2D LC „heart-cutting” off-line/on-line wykazała wysoką zawartość związków flawonoidowych w kwiatach badanych odmian *L. caerulea* var. *edulis*, co wyróżnia je spośród innych gatunków z rodzaju *Lonicera*. W owocach wiciokrzewów badanych odmian uprawowych wykazała obecność szeregu polifenoli niezidentyfikowanych przez innych badaczy – pochodnych flawan-3-olu (mono- i dimerycznych), w tym procyjanidynę B₂, niektórych antocyjanów pochodnych peonidyny.

W oparciu o opracowany system 2D LC potwierdziła obecność bogatego zespołu polifenoli w pędach malin, rozpoznając na tle dotychczasowych danych literaturowych, wiele dodatkowych pochodnych z grupy elagotanin. Analizując w cyklu wegetacyjnym metodą HPLC zmiany profili związków czynnych w pędach maliny właściwej pozyskanych z warunków naturalnych, wykazała że najkorzystniejszym okresem zbioru pędów maliny właściwej jako surowca przeciwprzeziębieniowego jest okres wiosenny.

Doktorantka kontynuowała prowadzone wcześniej w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji badania nad składem chemicznym owoców maliny właściwej i maliny zachodniej. W oparciu o przeprowadzone jakościowe analizy metodą 1D HPLC-DAD-ESI-MS i porównanie profili związków czynnych, wskazała że obecne w owocach malin pozostałe związki polifenolowe (z wyjątkiem dominujących antocyjanów) z grupy flawonoidów i prostych fenoli oraz elagotanin, poza sangwiną H-6 nie mają wpływu na ujawnione wcześniej różnice w efektach biologicznych owoców różnych odmian maliny właściwej.

Do interesujących wyników rozprawy należy ocena właściwości przeciwzapalnych (model obrzęku indukowany karageniną), przeciwbakteryjnych, oraz antyoksydacyjnych (DPPH, test fosforomolibdenowy) owoców *L. caerulea* var. *edulis* ‘Wojtek’. W oparciu o uzyskane wyniki Doktorantka wykazała, że w porównaniu do owoców maliny zachodniej, owoce wiciokrzewu sinego charakteryzują się słabszą aktywnością przeciwzapalną, antyoksydacyjną oraz przeciwdrobnoustrojową, natomiast silniejszą w porównaniu do owoców maliny właściwej. Jest to przypuszczalnie związane z obecnością w wyższym stężeniu antocyjanów pochodnych cyjanidyny, niektórych irydoidów a brakiem elagotanin. Badania zostały wykonane we współpracy z Zakładem Farmakodynamiki Katedry

Biofarmacji i Farmakodynamiki GUMed oraz Katedrą Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

W kontekście interesujących wyników wcześniejszych badań aktywności przeciwbakteryjnej owoców i pędów maliny właściwej oraz zachodniej Doktorantka przeprowadziła ocenę oddziaływań kombinacji ekstrakt roślinny-antybiotyk i wykazała, że obserwowane oddziaływania - synergizm, antagonizm lub addycja były zależne od typu zastosowanego ekstraktu, antybiotyku oraz szczepu bakteryjnego - są to pierwsze dane o interakcjach wyciągów z malin (owoce, pędy) z antybiotykami.

Wartościową częścią pracy są badania w zakresie aktywności biologicznej urolityn - produktów metabolizmu elagotanin i kwasu elagowego, związków czynnych nie tylko owoców i pędów malin ale również innych produktów żywnościowych pochodzenia roślinnego - owoców granatu, orzechów, truskawek i innych. Aktywność biologiczna urolityn jest obecnie przedmiotem wielu opublikowanych prac naukowych. Badania nad urolitynami były możliwe dzięki współpracy jaką Doktorantka nawiązała z Katedrą i Zakładem Chemii Organicznej GUMed, gdzie związki te były syntezowane. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania obejmowały ocenę właściwości przeciwbakteryjnych oraz cytotoksycznych wobec kilku linii komórek nowotworów piersi. Doktorantka we współpracy z Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej po raz pierwszy oceniła aktywność przeciwbakteryjną urolityn A-C oraz metylourolityn A-B wobec wybranych szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, stwierdzając, że właściwości przeciwbakteryjne urolityn, z wyjątkiem urolityny C, są słabsze od właściwości przeciwbakteryjnych ich prekursorów - sangwiny H-6 i kwasu elagowego. Natomiast aktywność cytotoksyczna urolityn A i C wobec linii komórek nowotworów piersi była silniejsza od związków wyjściowych sangwiny H-6 i kwasu elagowego.

Praca od strony edytorskiej nie wzbudza zastrzeżeń. Podział poszczególnych części stanowiących konstrukcję dysertacji jest czytelny i tworzą je: część teoretyczna, cel pracy, część doświadczalna, wyniki, omówienie wyników badań własnych, wyniki i wnioski. W obszernej części teoretycznej liczącej 52 strony Doktorantka przedstawiła charakterystykę botaniczną i fitochemiczną gatunków *Rubus idaeus* i *Rubus occidentalis*, oraz charakterystykę surowców z gatunku *Lonicera coerulea*. Ponadto omówiła aktualny stan wiedzy o bioaktywnych metabolitach elagotanin na tle ich biodostępności i właściwości biologicznych. Ta część pracy, obok obszernego rozdziału poświęconego omówieniu dwuwymiarowej chromatografii cieczowej, stanowi poparty licznymi pozycjami cytowanej literatury, wstęp

do właściwie zaplanowanych i zrealizowanych eksperymentów. Ich wyniki Doktorantka przedstawiła w 35 tabelach i na 51 rycinach.

Założone przez Doktorantkę cele pracy zostały zrealizowane a wyniki większości badań opublikowane na łamach czasopism: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2 publikacje), Journal of Food Composition and Analysis (1), Academia Journal of Medicinal Plants (1), Nutrition and Cancer (1) oraz Postępów Fitoterapii (2) o łącznej wartości Impact Factor 11,359.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca jest przedsięwzięciem o znacznym stopniu trudności, wymagającą od Doktorantki wszechstronnych umiejętności w tym przede wszystkim sprawności w zakresie analizy fitochemicznej w tym analizy chromatograficznej. Zakres przeprowadzonych badań dowodzi dużej pracowitości, konsekwencji, umiejętności planowania prac badawczych.

Przedstawiona dysertacja wnosi nowe informacje o składzie chemicznym i aktywności biologicznej badanych surowców. Rozprawa doktorska spełnia kryteria art.13 ust. 1. Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym [Dz. U. Nr 65 poz.595 z późn. zm.] co upoważnia mnie do wystąpienia z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału o dopuszczenie mgr Marty Kuli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Recenzent pracy doktorskiej prof., dr. habil. Valdimaras Janulis,
Kierownik Katedry Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego
Litewskiego Uniwersytetu Nauk Zdrowia

Kaunas (Lithuania), 8. 03. 2017