



**UNIWERSYTET MEDYCZNY**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

**Katedra i Zakład Farmakognozji**

**dr hab. n. farm. Izabela Fecka**

ul. Borowska 211A, 50-556 Wrocław, Tel.: +48 71 784 02 19 Fax: +48 71 784 02 18

sekretariat: [anna.hostynska@umed.wroc.pl](mailto:anna.hostynska@umed.wroc.pl), [www.umed.wroc.pl](http://www.umed.wroc.pl)

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr Barbary Król-Kogus**

**pt. „Badania składu chemicznego i aktywności biologicznej**

**surowca krajowego *Foenugraeci semen*”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska z dziedziny nauk farmaceutycznych została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. farm. Mirosławy Krauze-Baranowskiej, w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych na Wydziale Farmaceutycznym, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego i była częściowo finansowana z projektów badawczych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MN 0-0024/08) oraz Narodowego Centrum Nauki (NN405669140).

**Znaczenie i cel podjętych badań**

Zasadniczym celem rozprawy doktorskiej mgr Barbary Król-Kogus była analiza składu chemicznego surowca roślinnego *Foenugraeci semen* (*Trigonella foenum-graecum* L., Fabaceae), uprawianego w Polsce, poszerzona o ocenę jego wybranych właściwości biologicznych *in vitro*. Materiał roślinny stanowiły wysuszone nasiona pochodzące od trzech producentów krajowych (Flos, Kawon, Lewandowski), których skład frakcji flawonoidowej i saponinowej został porównany do odnośnych parametrów nasion kozieradki zebranych ze

stanu naturalnego w południowo-zachodniej Turcji (prowincja Antalya) i z uprawy w Algierii (Laghouat, *Département des Sciences Naturelles*).

Kozieradka pospolita uprawiana jest szeroko w Azji, Europie, Afryce i Ameryce Północnej jako gatunek dostarczający surowca spożywczego, leczniczego i jako roślina pastewna. Dotychczas szczegółowo przebadano skład nasiona *T. foenum-graecum* pochodzących z upraw azjatyckich i afrykańskich, które są materiałem wyjściowym w produkcji suplementów diety dostępnych na rynkach światowych, a także z uprawy doświadczalnej na południu Francji. Brak jednak odpowiednich danych w odniesieniu do surowca krajowego, co skłoniło Doktorantkę do podjęcia planowanych badań.

Cel rozprawy doktorskiej mgr Barbara Król-Kogus zrealizowała przez systematyczne wykonanie prawidłowo dobranych i zaplanowanych badań szczegółowych, obejmujących cele cząstkowe tj.:

- optymalizację warunków ekstrakcji C-glikozydowych pochodnych flawonów;
- opracowanie metod analizy jakościowej i ilościowej zespołu C-glikozydowych flawonów z zastosowaniem różnorodnych technik chromatograficznych, w tym chromatografii cieczowej (1D i 2D LC) z detektorem diodowym (DAD) i detektorem mas (ESI-MS) w układzie faz odwróconych oraz elucji w gradiencie fazy ruchomej, a także chromatografii cienkowarstwowej 1D i 2D (HP)TLC;
- identyfikację izoflawonów metodą HPLC-DAD-ESI-MS;
- opracowanie chromatograficznych metod analizy saponin steroidowych - 1D i 2D (HP)TLC z densytometrią, HPLC-ELSD i HPLC-ESI-MS;
- ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej otrzymanych wyciągów, frakcji i pojedynczych składników *Foenugraeci sem.* wobec wybranych patogenów;
- ocenę właściwości cytotoksycznych wyciągów, frakcji i pojedynczych składników w odniesieniu do linii komórek nowotworowych i prawidłowych oraz analizę mechanizmu aktywności pro-apoptotycznej.

Pani mgr Barbara Król-Kogus w swoich badaniach podjęła się zatem niełatwego zadania uzupełnienia wiedzy odnośnie składu fitochemicznego i potencjału biologicznego nasion kozieradki pospolitej uprawianej w kraju. Doktorantka do badań własnych wybrała

interesujący, jak się okazuje wciąż nie w pełni poznany surowiec roślinny, którego skład w dużym stopniu zależy od warunków uprawy i pochodzenia geograficznego.

### **Ocena merytoryczna**

Praca doktorska mgr Barbary Król-Kogus przedstawia typowy układ prac farmakognostycznych. W części teoretycznej obejmującej 66 stron Autorka przedstawiła stanowisko systematyczne gatunku, charakterystykę botaniczną *T. foenum-graecum* oraz dotychczasowy stan badań nad składem chemicznym nasion kozieradki ze szczególnym uwzględnieniem frakcji flawonoidowej i saponinowej. Kolejny rozdział poświęciła omówieniu poznanych aktywności biologicznych tego surowca, m.in. właściwości przeciwcukrzycowych, przeciwzapalnych, immunomodulujących, cytotoksycznych, przeciwdrobnoustrojowych, obniżających poziom lipidów w osoczu, a także wpływu na przewód pokarmowy, układ endokryny czy nerwowy. Interesującym elementem tej części rozprawy jest rozdział 4, w którym zamieściła na podstawie przeglądu obszernego piśmiennictwa naukowego opis techniki wielowymiarowej chromatografii cieczowej (MD-LC) w aspekcie analizy złożonych, wieloskładnikowych przetworów roślinnych.

Podsumowując, część teoretyczna stanowi bardzo dobrą podstawę do przedstawionych badań własnych. Opracowana jest w sposób rzeczowy i z zachowaniem zasad rzetelności naukowej oraz uwzględnia istotę podjętej tematyki.

W części doświadczalnej (liczącej 183 strony), mgr Barbara Król-Kogus przedstawiła obszernie zastosowane metody badawcze i materiał wykorzystany w analizie fitochemicznej oraz doświadczeniach biologicznych *in vitro*. Badania własne Autorka dobrze zaplanowała i metodycznie zrealizowała, a uzyskane wyniki z poszczególnych etapów szczegółowo omówiła w kontekście aktualnego piśmiennictwa z dziedziny. Rozdział poświęcony omówieniu wyników badań własnych wraz z dyskusją obejmuje 145 stron. Zebrane piśmiennictwo, w liczbie cytowanych pozycji 629, budzi szacunek dla niezwyklej umiejętności zarządzania tak obszerną bazą danych. Na zakończenie dysertacji, w rozdziale „WYNIKI I WNIOSKI” zamieściła w formie 10 punktów wnioski płynące z przeprowadzonych badań, które raczej stanowią ich podsumowanie. Odnosząc się do treści przytoczonego rozdziału należało wprowadzić tytuł „PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI” , gdyż wyniki

zostały zawarte w rozdziale „III. BADANIA WŁASNE”, poświęconym ich prezentacji i omówieniu. Następnie znajdują się streszczenia w języku polskim i angielskim.

Na wstępie planowanych badań, w celu opracowania optymalnych metod ekstrakcji surowca roślinnego mgr Barbara Król-Kogus przygotowała szereg wyciągów przy zastosowaniu rozpuszczalników niepolarnych i polarnych, dobranych odpowiednio dla saponin i flawonoidów. Ekstrakcję prowadziła z użyciem kilku technik - m.in. klasycznej w aparacie Soxhleta (także w wersji zautomatyzowanej, aparat B-811 Büchi, Szwajcaria), wspomaganej ultradźwiękami (UAE), wspomaganej mikrofalami (MAE) oraz techniką przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika (ASE), z wykorzystaniem nowoczesnej aparatury naukowej. Ten pierwszy bardzo żmudny etap jest jednym z ważniejszych elementów analizy fitochemicznej, istotnie wpływającym na wyniki uzyskane w dalszych etapach badań. W toku prac Doktorantka opracowała oryginalne metody analizy chromatograficznej pochodnych flawonów o budowie C-glikozydów, izoflawonów i saponin steroidowych, zarówno w odniesieniu do składu jak i zawartości poszczególnych związków. Metody ilościowe, zgodnie z obowiązującymi w badaniach analitycznych wytycznymi, poddała procesowi walidacji (testy liniowości, powtarzalności, precyzji pośredniej, specyficzności, stabilność, LOD i LOQ) by potwierdzić ich wiarygodność. Identyfikację poszczególnych składników z analizowanych grup przeprowadziła w oparciu o wyniki uzyskane z HPLC-DAD-ESI-MS (flawonoidy) lub HPLC-ESI-MS (saponiny) oraz dane z piśmiennictwa naukowego. Szczególnie wartościowe są metody dwuwymiarowe *on-line heart-cutting* LC-LC-DAD i *comprehensive* LCxLC-DAD-MS będące nowatorskim rozwiązaniem, zaproponowanym do analiz jakościowych i ilościowych C-glikozydów apigeniny i luteoliny. Metoda LCxLC-DAD-MS przy zastosowaniu kolumn modyfikowanych grupami fenyłowymi i/lub oktadecylowymi i elucji w warunkach gradientu VIII (1D), a następnie izokratycznej (2D), umożliwiła rozdzielenie oraz identyfikację 2 par izomerów położeniowych – monoglikozydów orientyny/izorientyny i diglikozydów szaftozydu/izoszaftozydu. W toku prowadzonych doświadczeń mgr Barbara Król-Kogus opracowała także efektywne metody chromatograficznej analizy saponin steroidowych kozieradki pospolitej, które z uwagi na brak grup chromoforowych są bardziej kłopotliwe w analizie. W oznaczeniach zawartości saponozydów typu furostanu zastosowała metodę HPLC z laserowym detektorem światła rozproszonego (ELSD) oraz metodę HPTLC-

densytometryczną na żelu Si60 dedykowaną oznaczeniom diosgeniny uwolnionej w wyniku hydrolizy w środowisku kwasowym.

Zwieńczeniem przeprowadzonej analizy składu fitochemicznego nasion kozieradki jest identyfikacja 20 związków o strukturze C-glikozydów pochodnych flawonów apigeniny i luteoliny, w tym 2 par izomerów acylowanych resztą kwasu *p*-kumarowego. Wśród oznaczonych struktur obecność 5 di-C-pentozydów apigeniny (związki 9, 10, 11, 12a i 13) opisała po raz pierwszy. Nie mniej jednak wyjaśnienie ich pełnej struktury wymaga dalszych prac badawczych. W surowcu pochodzenia krajowego wykluczyła natomiast obecność izoflawonów, z wyjątkiem biochaniny A, wydzielonych wcześniej z nasion kozieradki uprawianej w innych regionach geograficznych. Nie potwierdziła także występowania pochodnych O-glikozydowych, metoksylowych analogów, estryfikowanych i wolnych aglikonów. Badania frakcji saponinowej ujawniły natomiast w surowcu krajowym obecność 26 saponozydów typu furostanu, posiadających od 2 do 6 cząsteczek cukru w części glikozydowej, z pośród których 24 były uprzednio zidentyfikowane w nasionach kozieradki pochodzenia azjatyckiego lub afrykańskiego. Ponadto Doktorantka wykazała różnice w zawartości poszczególnych związków w surowcu polskim, tureckim i algierskim, a także w odniesieniu do danych naukowych opublikowanych dla nasion pochodzenia azjatyckiego i afrykańskiego.

W kolejnych etapach badań własnych mgr Barbara Król-Kogus przeprowadziła testy biologiczne – oceniła aktywność cytotoksyczną i przeciwdrobnoustrojową wyciągów, frakcji i indywidualnych składników nasion kozieradki. W badaniach cytotoksyczności *in vitro* zastosowała standardową (test MTT) i nowoczesną metodę oceny aktywności (pomiar zmiany impedancji RTCA, system Rea-Time xCEELigence) oraz wytyczne amerykańskiego Narodowego Instytutu Raka (NCI). Mechanizm aktywności cytotoksycznej analizowała z użyciem cytometru przepływowego, określając populację komórek apoptotycznych, potencjał mitochondrialny, aktywność kaspaz 3 i 7 oraz poziom stresu oksydacyjnego. W przypadku testów mikrobiologicznych wykorzystwała metodę mikrorozcieńczeń i dla badanych substancji wyznaczyła minimalne stężenia hamujące wzrost bakterii (MIC) oraz minimalne stężenia bakteriobójczego (MBC). Nie odnotowałam jednak w przywołanych rozdziałach informacji o zastosowaniu w doświadczeniach biologicznych kontroli pozytywnej, np. standardowego antybiotyku w testach mikrobiologicznych.

Badane C-glikozydy i alkaloid trygonelina nie wykazały działania cytotoksycznego wobec komórek ludzkich linii nowotworowych HeLa (raka szyjki macicy), SKOV-3 (gruczolakoraka jajnika) i MOLT-4 (białaczki limfoblastycznej), ani wobec linii komórek prawidłowych HaCaT (keratynocytów ludzkich). Aktywnością taką charakteryzowały się natomiast sapogeniny i badane przetwory kozieradki. Analiza danych zamieszczonych w tabelach 19, 21-23 (str. 222-223) skłania mnie do zadania pytania dotyczącego wpływu tych substancji na keratynocyty ludzkie. Z przedstawionych wyników można wnioskować, iż były one bardziej toksyczne dla komórek prawidłowych, co nie zostało omówione. Interesujące wyniki Autorka dysertacji uzyskała również w badaniach mikrobiologicznych, które potwierdziły aktywność przeciwdrobnoustrojową przetworów kozieradki oraz ich składników w stosunku do testowanych szczepów bakterii gram(+) i gram(-), w tym *Helicobacter pylori*.

W tym miejscu należy podkreślić, że przeprowadzone badania fitochemiczne i biologiczne, szczególnie dotyczące właściwości cytotoksycznych i mechanizmów molekularnych stojących u ich podstawy, w przypadku *Foenugraeci sem.* pochodzenia krajowego mają charakter nowości naukowej.

Przedstawiona do recenzji monografia mgr Barbary Król-Kogus została opracowana starannie i zgodnie z zasadami przyjętymi dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk farmaceutycznych. Napisana jest poprawną polszczyzną. Oceniając stronę graficzną pracy dostrzegam obszerne udokumentowanie przeprowadzonych doświadczeń w postaci zamieszczonych 23 tabel i 73 rycin (w tym licznych chromatogramów). Odnotowuję jednak brak spisu tabel i rycin, co nieco utrudnia poruszanie się w tym obszernym opracowaniu.

Funkcja recenzenta zobowiązuje mnie również do omówienia zauważonych, nielicznych błędów redakcyjnych. Zgodnie z nomenklaturą botaniczną i farmakognostyczną w zapisie binominalnym naukowych nazw gatunków roślin cytat - nazwisko autora, nie wyróżnia się kursywą, natomiast w nazwie łacińskiej substancji roślinnej drugi człon pisany jest z małej litery – *Foenugraeci semen* (str. 11, 12, 16 i in. ). Ponadto w innych przytoczonych w tekście rozprawy nazwach gatunków roślin brakuje cytatu (str. 50, 59, 60 i in.). Dalej, z uwagi na mnogość stosowanych technik chromatograficznych (tylko w LC aż 20 programów elucji gradientowej) należało ujednoczyć zapis wykorzystanych w badaniach

metod własnych, gdyż w monografii cytowane są z uwzględnieniem sposobu detekcji lub bez, komplikując tym samym analizę zestawień i chromatogramów.

Powyższe porządkujące uwagi nie wpływają w żadnej mierze na wysoką wartość naukową ocenianej rozprawy, a przedstawiona monografia spełnia wymagania stawiane w dziedzinie nauk farmaceutycznych i świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu jej Autorki do samodzielnego prowadzenia dalszych badań. Mgr Barbara Król-Kogus z sukcesem opanowała umiejętność planowania oraz systematycznej realizacji zadań naukowych. Wykazuje przy tym bardzo dobre zrozumienie zagadnień teoretycznych, znajomość warsztatu badań fitochemicznych i biologicznych oraz potrafi podsumować i krytycznie omówić wyniki własne w odniesieniu do danych z piśmiennictwa naukowego. Solidne przygotowanie znalazło swój wyraz w szerokiej dyskusji i prawidłowo wyprowadzonych wnioskach.

Dotychczasowy dorobek naukowy Doktorantki obejmuje 4 publikacje, w tym 1 anglojęzyczną publikację doświadczalną w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej i 3 publikacje przeglądowe w języku polskim. Pani magister jest pierwszym autorem we wszystkich powyższych artykułach. Tematyka tych prac związana jest z recenzowaną rozprawą doktorską.

### **Wnioski końcowe**

Przedstawioną do recenzji monografię, z uwagi na duże walory naukowe i praktyczne, oceniam bardzo wysoko. Pragnę również wyrazić uznanie dla osiągnięć Doktorantki Pani mgr Barbary Król-Kogus, które mogły powstać wyłącznie pod naukowym przewodnictwem tak znakomitego farmakognosty jak Pani Profesor Mirosława Krauze-Baranowska.

W świetle powyższej, pozytywnej oceny stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Barbary Król-Kogus spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z dn. 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami).

Wrocław, 20.04.2017 r.

Na tej podstawie **wniosuję do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o jej przyjęcie i dopuszczenie Pani mgr Barbary Król-Kogus do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Zaangażowanie w pracę naukową Doktorantki oraz opracowanie oryginalnych i nowatorskich metod badawczych, wykorzystanych w analizie krajowego surowca roślinnego o potencjale leczniczym **zasługuje w moim przekonaniu na wyróżnienie.**

*dr hab. n. farm. Izabela Fecka*

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
KATEDRA I ZAKŁAD FARMAKOGNOZJI  
Farmakognoszczyk  
*I Fecka*  
dr hab. Izabela Fecka  
(1)