



Zakład Farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
ul. Mickiewicza 2a, 15-230 Białystok, Polska
tel.: 85-748-56-92; fax.: 85-748-54-16
e-mail: michal.tomczyk@umb.edu.pl

Białystok, 11 listopada 2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej zatytułowanej „**Badania estrów kwasu kawowego w niektórych gatunkach z rodzaju *Symphytum* i *Arnica* z oceną *in vitro* aktywności przeciwzapalnej oraz dostępności farmaceutycznej**”

Pani mgr farm. Katarzyny Kimel

wykonanej pod kierunkiem Pani Prof. Mirosławy Krauze-Baranowskiej w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych, Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Pani Prof. Małgorzaty Sznitowskiej z Katedry i Zakładu Farmacji Stosowanej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Współczesna fitoterapia swój niekwestionowany rozwój zawdzięcza wysokiemu udziałowi wykorzystywanych nowatorskich metod badawczych który pozwolił na skutecznie odkrywanie potencjału terapeutycznego związków pochodzenia naturalnego. Wiele interdyscyplinarnych technik takich jak bioinformatyka (networking), metabolomika (techniki omiczne), sekwencjonowanie genów czy spektrometria mas zapewniają obecnie badaczom wiele możliwości analitycznych pozwalających na kompleksową ocenę surowców czy związków pochodzenia roślinnego zarówno ich profilu fitochemicznego jak i oceny pod kątem aktywności biologicznej czy farmakologicznej. Produkty naturalne stanowią obecnie bogate źródło nowych kandydatów na leki. Warto jednak zauważyć, że wiele z nich przechodzi obecnie badania kliniczne przy czym nie wolno pomijać faktu ich badań poprzez techniki oceny aktywności biologicznej (*in vitro*) czy metody z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych (*in vivo*) które są obecnie istotnym elementem w potwierdzeniu ich zarówno skuteczności jak i bezpieczeństwa stosowania.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Kimel została złożona w formie monografii opisującej wyniki jedynie częściowo zawarte aż w sześciu publikacjach w tym w czterech oryginalnych i dwóch pracach poglądowych.

Publikacje oryginalne/eksperymentalne:

1. K. Kimel, S. Godlewska, M. Krauze-Baranowska, L. Pobłocka-Olech (2019) HPLC-DAD-ESI/MS analysis of *Arnica* TM constituents. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 7 (6): 1015-1027, DOI: 10.32383/appdr/112187
2. K. Kimel, M. Zienkiewicz, B. Sparzak-Stefanowska, M. Krauze-Baranowska (2020) TLC-densitometric analysis of allanoin in *Symphytum officinale* L. roots. *Acta Pharmaceutica*, 70: 101-110, DOI: 10.2478/acph-2020-0014
3. K. Kimel, S. Godlewska, M. Krauze-Baranowska, L. Pobłocka-Olech (2020) HPLC-DAD-ESI/MS comparison of the chemical composition of flowers from two *Arnica* species grown in Poland. *Herba Polonica*, 77 (2): 1-10, DOI: 10.2478/hepo-2020-0008
4. K. Kimel, S. Godlewska, M. Gleńsk, K. Gobis, J. Ośko, M. Grembecka, M. Krauze-Baranowska (2023) HPLC-MS/MS evaluation of pyrrolizidine alkaloids profile in relation to safety of

Prace przeglądowe:

1. K. Kimel, M. Krauze-Baranowska (2021) Skuteczność i bezpieczeństwo stosowania korzenia *Symphytum officinale* L. – przegląd danych literaturowych. *Postępy Fitoterapii*, 22 (1): 23-31, DOI: 0.25121/PF.2021.22.1.23
2. M. Krauze-Baranowska, K. Kimel (2022) Arnika górską i jej znaczenie lecznicze w świetle badań naukowych. *Farmacja Polska*, 78 (9): 491-502, DOI: 10.32383/farmpol/156952

Doktorantka, podejmując się realizacji założonych i dobrze zdefiniowanych celów badawczych zrealizowała bardzo trudny eksperyment fitochemiczny w tym badania strukturalne estrów kwasu kawowego, z wybranych do badań dwóch gatunków roślin *Arnica montana* L. (Asteraceae) oraz *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae). Do badań swoich włączyła również, stosowane tradycyjnie w tym samym zakresie, ale charakteryzujące się słabo rozpoznany składem chemicznym, liście żywokostu lekarskiego oraz kwiaty arniki łąkowej (*A. chamissonis* Less.), a także nalewkę homeopatyczną ze świeżej całej rośliny arniki górskiej (*Arnica* TM). Podstawowym celem badań było rozpoznanie chromatograficzne zespołów związków biologicznie aktywnych w tym estrów pochodnych kwasu kawowego w substancjach roślinnych czynnych pozyskiwanych z gatunków *Arnica montana* L., *A. chamissonis* Less. i *Symphytum officinale* L. oraz ocena ich dostępności farmaceutycznej z określeniem udziału w aktywności antyoksydacyjnej jako części aktywności przeciwwzapalnej na tle innych obecnych w nich metabolitów wtórnych.

Na uwagę zasługuje opracowanie nowych metod analizy jakościowej i ilościowej zespołów estrów pochodnych kwasu kawowego oraz innych związków o charakterze polifenoli z użyciem HPLC w sprzężeniu z detektorem z matrycą diodową (DAD), spektrometrem mas (MS) oraz technik jedno- i dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej (1D i 2D TLC). Ten etap pracy doktorskiej stanowi o wysokim poziomie naukowym rozprawy i jest niekwestionowaną nowością naukową. Bardzo pracochłonne etapy badań rozwinięte zostały o identyfikację nowych związków z grupy estrów pochodnych kwasu kawowego stanowiących składniki wyciągów z badanych surowców roślinnych metodami HPLC-DAD-MS oraz opracowanie metod ich izolacji w szczególności z korzenia żywokostu z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Jednakże, nie tylko pochodne kwasu kawowego były przedmiotem badań chromatograficznych gdyż Doktorantka podjęła się także opracowania nowych zwalidowanych metod analitycznych innych metabolitów wtórnych odgrywających rolę w aktywności biologicznej badanych surowców, a mianowicie metody TLC sprzężonej z densytometrią do analizy jakościowej i ilościowej pochodnej 5-ureidohydantoiny, alantoiny w wyciągach metanolowych z żywokostu lekarskiego, metody HPLC-MS/MS w analizie jakościowej i ilościowej oraz składu zespołu alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu i liściu żywokostu czy metody HPLC-DAD-ESI/MS i TLC do analizy laktonów seskwiterpenowych obecnych w wyciągach z kwiatów arniki górskiej i łąkowej, w tym obecnych w nalewce ze świeżej całej rośliny arniki górskiej. Ciekawym i istotnym elementem badań była również przeprowadzona ocena aktywności przeciwutleniającej i przeciwwzapalnej wyciągów oraz związków czynnych z korzenia i liścia żywokostu lekarskiego oraz kwiatów arniki górskiej i łąkowej, a także ocena dostępności farmaceutycznej estrów pochodnych kwasu kawowego, oraz helenaliny i alkaloidów pirolizydynowych, jako składników wyciągów z badanych surowców oraz czystych związków.

mgr Katarzyna Kimel zidentyfikowała skład jakościowy estrów pochodnych kwasu kawowego i innych związków polifenolowych w surowcach otrzymany z żywokostu lekarskiego, potwierdzając obecność kwasu kawowego, kwasu rozmarynowego, globoidnanu A, globoidnanu B i rabdozyny w korzeniu żywokostu oraz ujawniając obecność globoidnanu A i szeregu glikozydów flawonoidów w wyciągu z liścia żywokostu. W celu identyfikacji strukturalnej globoidnanu A opracowała metodę jego izolacji z wyciągu metanolowego z korzenia żywokostu z użyciem

automatycznej ekstrakcji do fazy stałej SPE. Strukturę chemiczną globoidnanu A potwierdziła z użyciem technik spektralnych NMR oraz analiz wielkoskalowych w tym HPLC-DAD-MS. Zoptymalizowane warunki rozdzielania HPLC wykorzystana natomiast do przeprowadzenia analizy ilościowej zawartości kwasów kawowego i rozmarynowego, globoidnanu A i B w korzeniach żywokostu oraz kwasów kawowego i rozmarynowego czy pochodnych kwercetyny i kemferolu w liściu żywokostu. Opracowana metoda została zwalidowana, a otrzymane wyniki ujawniły duże zróżnicowanie w składzie ilościowym substancji roślinnych czynnych z żywokostu lekarskiego w zależności od ich pochodzenia. Wyciągi metanolowe z liścia żywokostu charakteryzowały się wyższą zawartością kwasów fenolowych w porównaniu do korzenia żywokostu, z dominacją w zespole kwasu rozmarynowego. Udział poszczególnych pochodnych kwasu kawowego w badanych wyciągach z korzenia żywokostu był zróżnicowany, w zależności od pochodzenia surowca związku dominujące stanowiły kwas rozmarynowy, globoidnan A lub B. W ostatnim etapie prac nad surowcami uzyskanymi z żywokostu lekarskiego stanowiło opracowanie metody HPLC-MS/MS analizy jakościowej i ilościowej zespołu alkaloidów pirolizydynowych (PAs) z zastosowaniem techniki MRM w trybie jonizacji dodatniej. Opracowana metoda pozwoliła na uzyskanie separacji i identyfikację zespołu aż 17 alkaloidów pirolizydynowych o szkielecie 1,2-nienasyconej necyny, obejmującego intermedynę, likopsaminę i ich *N*-tlenki, *N*-tlenek dihydrointermedyny /dihydrolikopsaminy, acetylointermedynę, acetylolikopsaminę i ich *N*-tlenki, *N*-tlenek 7'-saracynylo-9-trachelantylotretronecyny, *N*-tlenek 7'-saracynylo-9-wiridifloryloretronecyny, *N*-tlenek echimidyny, symfitynę, symlandynę i ich *N*-tlenki oraz *N*-tlenek 3'-acetylosymfityny i jego izomery. Po raz pierwszy Doktorantka zidentyfikowała pełny profil tej grupy alkaloidów PAs obecnych w liściu żywokostu potwierdzając obecność wyżej wymienionych związków z wyjątkiem *N*-tlenku 3'-acetylosymfityny, obecnego w korzeniu w śladowych ilościach. Opracowane warunki rozdzielania HPLC-MS/MS wykorzystano do przeprowadzenia analizy ilościowej, która wykazała dominację *N*-tlenków intermedyny i likopsaminy, obok ich wolnych form i *N*-tlenków form acetylowych w zespole PAs korzenia żywokostu oraz *N*-tlenków i wolnych form intermedyny i likopsaminy w liściu żywokostu. Ten etap jest bardzo ważny w ocenie zawartości PAs gdyż grupa tych substancji podlega obecnie szczególnej kontroli w zakresie roślinnych surowców leczniczych.

Drugim obiektem badań opisanych w rozprawie doktorskiej mgr Kimel były kwiaty dwóch gatunków leczniczych (równocennych) *Arnica montana* oraz *A. chamissonis* (Asteraceae). Doktorantka opracowała i zwalidowała warunki analizy jakościowej i ilościowej zespołu związków polifenolowych obecnych w wyciągach metanolowych z kwiatów zarówno arniki górskiej i łąkowej oraz nalewkach z całej świeżej rośliny arniki górskiej metodą HPLC-DAD-ESI/MS. Przeprowadzona analiza porównawcza wykazała różnice w składzie jakościowym pomiędzy badanymi przetworami z arniki. Nalewka *Arnica* TM wyróżniła się obecnością, niewykrytych w kwiatkach *A. montana* i *A. chamissonis* pochodnych kwasu trikawoilochinowego oraz 6-metoksyapigeniny, przy braku obecności występujących w obydwu surowcach 7-glukozydu luteoliny, 3-glukozydu, 6-metoksykemferolu, 7-glukozydu apigeniny i dwóch pochodnych kwasu kawowego o bliżej nierozpoznanych strukturach. Wyciąg metanolowy z kwiatu arniki łąkowej wyróżnił się obecnością patuletyny, 6-metoksykemferolu i kwercetyny, nieobecnych w nalewce oraz kwiatkach arniki górskiej. W toku analizy fitochemicznej wyciągów z kwiatu arniki górskiej i łąkowej oraz nalewek *Arnica* TM opracowała i zwalidowała również warunki analizy jakościowej i ilościowej zespołu laktonów seskwiterpenowych metodą HPLC-DAD-ESI/MS. Stosując opracowane warunki rozdzielania HPLC Doktorantka po raz pierwszy rozpoznała zespół laktonów seskwiterpenowych obecnych w nalewce świeżej całej rośliny arniki górskiej (*Arnica* TM; Boiron, Francja), potwierdzając obecność szeregu pochodnych helenaliny. Dodatkowo, opracowała warunki rozdzielania estrów helenaliny i dihydrohelenaliny metodami 1D TLC w systemie MGD.

W końcowym etapie pracy mgr Kimel dokonała oceny aktywności przeciwutleniającej jako badanych substancji roślinnych z wykorzystaniem testów spektrofotometrycznych DPPH, FRAP i ABTS, w teście bioautografii techniką TLC (test DPPH, test hamowania oksydazy ksantynowej i układ ryboflawina-światło-NBT) oraz testów ELISA do oznaczeń aktywności hamującej COX-1 i COX-2. W ocenie aktywności przeciwutleniającej wyciągów metanolowych z korzeni i liści

żywakostu lekarskiego z użyciem testów spektrofotometrycznych wykazała istotne statystycznie różnice w aktywności wyciągów z korzeni żywakostu. Jednocześnie wyciągi z liści żywakostu charakteryzowały się, w porównaniu do wyciągów metanolowych z korzeni żywakostu wyższą zdolnością do redukcji jonów żelaza, mierzoną testem FRAP i niemal 2-krotnie wyższą aktywnością przeciwrodnikową mierzoną testem ABTS, przy zbliżonej aktywności wymiatającej wolne rodniki, mierzonej testami DPPH. Analiza statystyczna wykazała wysoką korelację pomiędzy zawartością kwasu rozmarynowego a wynikami testów DPPH i FRAP oraz umiarkowaną korelację pomiędzy zawartością kwasu kawowego a wynikami testu DPPH i zawartością globoidnanu A a wynikami FRAP i ABTS, potwierdzając tym samym rolę pochodnych kwasu kawowego w aktywności antyoksydacyjnej surowców otrzymywanych z korzeni i liści żywakostu.

Dodatkowo, Doktorantka potwierdziła aktywność antyoksydacyjną badanych surowców z użyciem testu bioautografii techniką TLC. Przeprowadzone eksperymenty wykazały aktywność przeciwutleniającą (wymiatanie wolnych rodników) oraz zdolność do hamowania aktywności oksydazy ksantynowej dla obecnego w wyciągach z korzenia i liścia żywakostu kwasu kawowego oraz jego pochodnych – kwasu rozmarynowego i globoidnanu A.

Dla wyciągów metanolowych z liścia żywakostu otrzymanych różnymi metodami ekstrakcji oraz dwóch wyciągów metanolowych z korzenia żywakostu przeprowadziła dodatkowo ocenę aktywności hamującej COX-1 i COX-2. Wykazała, że wyciągi metanolowe z korzenia i liścia żywakostu charakteryzują się wyższą aktywnością hamującą COX-1 w porównaniu do COX-2. Podobnie, badania aktywności przeciwutleniającej przetworów z arniki obejmowały porównanie wyciągów metanolowych z kwiatów arniki górskiej i łąkowej. Ocena aktywności z użyciem testów spektrofotometrycznych wykazała, że obydwie surowce charakteryzują się zbliżoną siłą działania antyoksydacyjnego. Zastosowanie testów bioautograficznych w sprzężeniu z TLC również wskazało na bardzo zbliżone profile substancji o aktywności przeciwutleniającej – w obydwu badanych wyciągach działanie wymiatające wolne rodniki w teście DPPH wykazały wszystkie związki polifenolowe rozdzielone na chromatogramie TLC, podczas gdy test hamowania oksydazy ksantynowej potwierdził działanie enzymatyczne jedynie dla zespołu kwasów fenolowych. Porównując aktywność wyciągów alkoholowych otrzymanych z użyciem różnych rozpuszczalników wykazano silniejszą aktywność przeciwutleniającą składników wyciągów metanolowych w porównaniu z wyciągami etanolowymi.

W ostatnim etapie realizowanych w doktoracie eksperymentów Doktorantka przeprowadziła ocenę dostępności farmaceutycznej jako stopnia przenikania przez błony półprzepuszczalne imitujące ludzką skórę, dla kwasów fenolowych obecnych w wyciągu z korzenia i liścia żywakostu lekarskiego oraz wyciągu z arniki górskiej, a także helenaliny i alkaloidów pirolizydynowych. Wykazała w ten sposób wysoki stopień przenikania kwasu kawowego i jego pochodnych (kwas rozmarynowy, globoidnan A) przez błonę celulozową na poziomie powyżej 72% dla składników wyciągu z korzenia żywakostu (kwas kawowy, kwas rozmarynowy, globoidnan A) oraz powyżej 48% dla składników wyciągu z liścia żywakostu (kwas kawowy, kwas rozmarynowy). Jednocześnie, nie potwierdziła zdolności wymienionych związków oraz kwasów dikawoilochinowych do penetracji przez membranę Strat-M, stanowiącą model lepiej odzwierciedlający warunki dla ludzkiej skóry, jako składników wyciągu oraz jako pojedynczych związków. Ekstrakcja użytych w eksperymencie błon półprzepuszczalnych Start-M wykazała absorpcję w ich warstwach kwasu kawowego (54,15% z korzenia żywakostu, 8,37% z liścia żywakostu), kwasu rozmarynowego (4,09% i 1,13%, odpowiednio z korzenia i liścia) i kwasu chlorogenowego (0,72% z kwiatu arniki górskiej). Nie wykazano obecności globoidnanu A. Badania dla innych grup metabolitów wtórnych wykazały zdolność do przenikania przez błonę Strat-M roztworu wzorca helenaliny na poziomie niemal 25%. Związek nie został wykryty w płynie akceptorowym po aplikacji wyciągu z kwiatu arniki górskiej. Z kolei w zespole alkaloidów pirolizydynowych korzenia i liścia żywakostu lekarskiego wykazano przenikanie przez błonę półprzepuszczalną Strat-M *N*-tlenków intermedyny i likopsaminy na bardzo niskim poziomie.

Jak słusznie konkluduje Doktorantka, zaobserwowane różnice w zawartości związków biologicznie czynnych oraz w ocenie aktywności biologicznej wybranych do badań surowców w tym

ocenie ich bezpieczeństwa (zawartość alkaloidów pirolizydynowych) stanowić mogą przedmiot dalszych badań w tym koniecznością objęcia ich dodatkową kontrolą lub standaryzacją.

Bardzo wysoko oceniam uzyskane wyniki jak i ogrom zaangażowania włożonego w ich przygotowanie. Otrzymane wyniki wskazują na nowe perspektywy i możliwości w badaniach produktów pochodzenia naturalnego w leczeniu chorób skórnych. Jednocześnie uzyskane wyniki wskazują na ich wysoką aplikacyjność.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zapytać o pewne kwestie warte przedyskutowania podczas obrony pracy doktorskiej.

1. Czym wytłumaczyć można wykazaną silniejszą aktywność przeciwutleniającą składników wyciągów metanolowych w porównaniu z wyciągami etanolowymi?
2. Czy biorąc pod uwagę istotną rolę mikrobioty, uzasadnione wydaje się również zbadanie interakcji między mikrobiotą skóry, a związkami pochodzenia roślinnego stosowanymi miejscowo w fitoterapii? Czy mogłaby Pani rozwinąć ten temat i ocenić ten bardzo interesujący kierunek badań?

Bardzo wysoko oceniam rangę i znaczenie przedstawionych w rozprawie wielokierunkowych badań podjętych w zespole badawczym pod kierunkiem Pani Prof. Mirosławy Krauze-Baranowskiej. Lektura dysertacji uprawnia mnie do stwierdzenia, że Autorka wykazała się zdolnością w opanowaniu olbrzymiej ilości technik pracy w laboratorium i to nie tylko analiz fitochemicznych ale i bardzo wymagających technik oceny aktywności biologicznej. Przedstawione wyniki badań wskazują na dojrzałość badawczą Doktorantki jak i niebywałą dociekliwość naukową. W mojej ocenie tak kompleksowe podejście do tematu i rozbudowane studium badań nad nowymi aspektami surowców w ocenie zarówno fitochemicznej jak i analizie aktywności biologicznej oraz pochylenie się nad pewnymi aspektami biodostępności farmaceutycznej zostało zrealizowane wzorcowo. Uważam, iż tak ogromna ilość materiału naukowego pozwoliłaby na sfinalizowanie jeszcze jednej rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska mgr farm. Katarzyny Kimel jest niezwykle wartościowa zarówno z naukowego jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Wnoszę tym samym do Komisji powołanej do przeprowadzenia postępowania w sprawie nadania stopnia doktora Pani mgr farm. Katarzynie Kimel o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Wniosek swój motywuję bardzo wysokim poziomem naukowym rozprawy uwzględniającym nie tylko aspekty nowości i oryginalności naukowej w tym po raz stworzenie nowych metod analitycznych, wykorzystanie nowoczesnych technik omicznych, ale również ze względu na wysoką wartość poznawczą i merytoryczną rozprawy.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr farm. Katarzyny Kimel spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742), i zwracam się o dopuszczenie Pani mgr Kimel do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnioskuję do Rady Kolegium Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o nadanie mgr farm. Katarzynie Kimel stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne z wyróżnieniem.

Michał Tomczyk