



UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Farmakognozji

Prof. 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, www.umed.wroc.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Katarzyny Kimel

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

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska z dyscypliny nauk farmaceutycznych została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. n. farm. Mirosławy Krauze-Baranowskiej (promotor) oraz prof. dr hab. n. farm. Małgorzaty Sznitowskiej (drugi promotor), w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji na Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Magister Katarzyna Kimel swoją rozprawę doktorską przedstawiła w formie monografii naukowej, która obejmuje wyniki wcześniej niepublikowane oraz przedstawione w 6 powiązanych tematycznie artykułach naukowych (w tym 4 doświadczalnych i 2 przeglądowych) ogłoszonych w latach 2019-2023 w uznanych czasopismach o zasięgu krajowym (2 artykuły) i międzynarodowym (4 artykuły):

publikacje 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 Allantoin 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 Comfrey Roots and Leaves from Polish Sources. *Molecules* 2023, 28(16), 6171, DOI: 10.3390/molecules28166171

publikacje przeglądowe

- 5) **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
- 6) 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

W dorobku naukowym Doktorantki znajdują się dodatkowo prezentacje ustne (4) i posterowe (6) przedstawione podczas konferencji naukowych w okresie od roku 2018 do 2023, m.in.: *Trends in Natural Product Research – PSE Young Scientists' Meeting* – Kolybari, Kreta (Grecja) 2022; *17th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation Technology*, Gandawa (Belgia) 2022; *13th i 16th World Congress on Polyphenols Applications - Malta Polyphenols* 2019 i 2023; *64th i 65th International Pharmaceutical Students' Federation World Congress*, Mendoza (Argentyna) 2018 i Kigali (Rwanda) 2019.

W większości wymienionych artykułów i prezentacji Pani Magister jest pierwszym autorem (drugim w jednej publikacji przeglądowej), co świadczy o Jej istotnym wkładzie w ich powstanie i ogłoszenie, choć w przesłanej dokumentacji nie przedstawiono opisu indywidualnego wkładu Doktorantki i pozostałych współautorów.

Badania przedstawione w dysertacji, mgr Katarzyna Kimel zrealizowała przy wsparciu z projektu "*Interdyscyplinarny program studiów doktoranckich jako narzędzie kształcenia kadr dla nauki i gospodarki w obszarze profilaktyki i terapii chorób cywilizacyjnych*", w Programie Operacyjnym Wiedza-Edukacja-Rozwój 2014-2020 (POWER.03.02.00-IP.08.00-DOK/16) i współfinansowaniu ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.

Zasadnicze cele recenzowanej rozprawy doktorskiej zakładały szczegółową analizę składu chemicznego substancji i przetworów roślinnych pozyskanych z trzech gatunków roślin leczniczych – *Arnica montana* L. (arnika górską), *A. chamissonis* Less. (arnika łąkowa) i *Symphytum officinale* L. (żywokost lekarski). Badania koncentrowały się na rozpoznaniu zespołu estrowych pochodnych kwasu

kawowego (związków roślinnych o dobrze udokumentowanej aktywności biologicznej) z określeniem ich udziału w potencjale antyoksydacyjnym jako składowej aktywności przeciwzapalnej. Doktorantka przedstawiła dodatkowo wyniki dla innych metabolitów wtórnych występujących w surowcach pozyskiwanych z powyższych gatunków, a istotnych dla skuteczności lub bezpieczeństwa stosowania. Na zakończenie prac badawczych oceniła *in vitro* przenikanie i absorpcję reprezentacyjnych składników i przetworów przez półprzepuszczalne błony imitujące skórę (*Spectra-Por Dialysis Membrane, Strat-M Membrane*). To szeroko zakrojone podejście analityczne do wskazanych celów solidnie uzasadniła. Szczególnie godnym uznania jest zamiar wyjaśnienia wzajemnych oddziaływań współistniejących w analizowanych przetworach roślinnych metabolitów wtórnych oraz poziom trudności planowanych eksperymentów wynikający ze złożonego składu gatunków przedstawionych w monografii.

Badane substancje roślinne i ich przetwory znajdują zasadniczo zastosowane w terapii wspomagającej chorób reumatycznych i układu mięśniowo-szkieletowego (dolegliwości bólowych, kontuzji i urazów takich jak stłuczenia, złamania, skręcenia), w podaniu miejscowym. Opublikowane dotychczas dane przedkliniczne i kliniczne potwierdzają ich skuteczność w tych wskazaniach, porównywalną do standardowo stosowanych leków syntetycznych (np. Frost, O'Meara i MacPherson, *The external use of comfrey: a practitioner survey. Complement Ther. Clin. Pract., 2014, 20, 347-355*). Uważa się, że w ogólnym efekcie leczniczym *Symphyti radix* istotną rolę odgrywa działanie przeciwzapalne i przeciwbólowe alantoiny oraz pochodnych kwasu kawowego (Trifan i wsp., *Symphytum officinale L.: Liquid-liquid chromatography isolation of caffeic acid oligomers and evaluation of their influence on pro-inflammatory cytokine release in LPS-stimulated neutrophils. J. Ethnopharmacol. 2020, 262, 113-169*). Jednak ze względu na działania niepożądane związane z obecnością geno- i cytotoksycznych alkaloidów pirolizydynowych, korzeni żywokostu obecnie nie rekomenduje się w podaniu doustnym. Podobnie w przypadku seskwiterpenów kwiatów arniki. Aktywność przeciwzapalna *Arnicae flos*, w szczególności zdolność do hamowania sygnalizacji NF- κ B i dalszych szlaków, w których pośredniczy 5-lipoksygenaza (5-LO) i cyklooksygenaza-2 (COX-2), jest dobrze udokumentowana (Röhrli i wsp., *Anti-inflammatory activities of arnica montana planta tota versus flower extracts: analytical, in vitro and in vivo mouse paw oedema model studies. Plants, 2023, 12, 6, 1348*).

Przetwory z substancji roślinnych pozyskiwane z arniki i żywokostu stanowią materiał wyjściowy podczas wytwarzania tradycyjnych leków roślinnych, a także produktów kosmetycznych i homeopatycznych (świeże ziele arniki z korzeniem, tzw. „cała” roślina). Jednak wyłącznie w odniesieniu do leków skład chemiczny materiału roślinnego zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa farmaceutycznego podlega standaryzacji i systematycznej kontroli według norm zdefiniowanych w

farmakopei. Aktualne edycje Farmakopei Europejskiej (Ph.Eur.11) i Farmakopei Polskiej (FPXII) podają monografie kwiatu arniki (*Arnicae flos*) i nalewki z kwiatu arniki (*Arnicae tinctura*), dla których ustanowiono wymagania w zakresie zawartości minimalnej laktonów seskwiterpenowych w przeliczeniu na tyglinian dihydrohelenaliny. *Arnicae flos* (z *A. montana*) i *Symphyti radix* (z *S. officinale*) są również objęte monografiami Komitetu ds. Roślinnych Produktów Leczniczych, przy Europejskiej Agencji Leków (EMA/HMPC). W obrocie pozaaptecznym (sklepy zielarskie i zielarsko-medyczne) dostępne są również inne substancje roślinne jak liść żywokostu i kwiat arniki łąkowej (z *A. chamissonis*) o słabo poznanym składzie chemicznym. Dane z piśmiennictwa naukowego odnoszące się do składu chemicznego *A. montana* dotyczą głównie kwiatów wysuszonych, natomiast nieznaną pozostał profil chemiczny kwiatów świeżych oraz świeżego ziela z korzeniem (części nadziemnych i podziemnych, *Arnica planta tota*), stanowiących materiał roślinny do produkcji preparatów homeopatycznych (tj. nalewki macierzystej *Arnica TM*, wytwarzanych przez Boiron i Helios Homeopathy). Drugi bardziej rozpowszechniony gatunek z tego rodzaju *A. chamissonis*, wykorzystywany w medycynie tradycyjnej i uwzględniany we wcześniejszej monografii *Arnicae anthodium* FPV (substancja standaryzowana na flawonoidy w przeliczeniu na kwercetynę), również był słabo rozpoznany do czasu badań przeprowadzonych przez mgr Katarzynę Kimel.

Przetwory z powyższych gatunków, poza seskwiterpenami i alkaloidami zawierają w swoim składzie chemicznym liczne związki o strukturze polifenoli, m.in. fenolokwasy i flawonoidy, zaliczane do aktywnych biologicznie metabolitów wtórnych roślin. Polifenolom przypisuje się aktywność antyoksydacyjną *per se* oraz działanie przeciwzapalną przez modulowanie ekspresji cytokin prozapalnych czy redukcję poziomu czynnika transkrypcyjnego NFκB, a także hamowanie niektórych enzymów – m.in. hialuronidazy, COX-1 i 2 oraz 5-LO. Związki z tych grup odgrywają istotną rolę w aktywności biologicznej substancji i przetworów roślinnych, mogą ze sobą współdziałać i warunkować synergii, która skutkuje zwiększeniem efektu leczniczego, a także decydować o poliwalencji – wielokierunkowości tego efektu. Działanie lecznicze surowców z *A. montana*, *A. chamissonis* i *S. officinale* powiązane z występowaniem laktonów seskwiterpenowych w arnikach (helenalina i jej estry) oraz alantoiny w żywokoście lekarskim. Niemniej jednak, pochodne kwasu kawowego i flawonoidy mogą uczestniczyć w ogólnej aktywności biologicznej, co nie zostało ostatecznie rozpoznane. Ponadto polifenole mogą wpływać na biodostępność innych składników, np. przenikanie przez skórę helenaliny i jej analogów. Publikacje innych autorów, poprzedzające prace Doktorantki, wskazywały na obecność nieznaną pochodnych kwasu kawowego w korzeniach żywokostu oraz kwiatkach arniki. Estrom kwasu kawowego, znanym również pod nazwą kawotanoidów lub kawolidów, przypisuje się szersze spektrum działania biologicznego, obejmującego poza aktywnością przeciwutleniającą i przeciwzapalną, także działanie przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne,

antyglukacyjne i neuroprotektoryjne. Jednak ich rola w działaniu leczniczym przetworów z arniki i żywokostu wciąż nie została w pełni poznana. Do momentu rozpoczęcia przez mgr Katarzynę Kimel badań szczególnie brakowało danych dotyczących udziału tych pochodnych w aktywności będących w użyciu kwiatów arniki łąkowej, nalewki *Arnica TM* i liści żywokostu. Zatem podjęcie się przez Doktorantkę tego zadania badawczego jest jak najbardziej zasadne na tle przeprowadzonej kwerendy piśmiennictwa z zakresu tematyki.

Omówienie osiągnięć naukowych

W ocenianej rozprawie doktorskiej mgr Katarzyna Kimel przedstawiła wyniki z badań nad zespołem estrowych pochodnych kwasu kawowego, obecnych w surowcach z trzech gatunków roślin leczniczych - *A. montana* i *A. chamissonis* (kwiat, ziele z korzeniem) oraz *S. officinale* (korzeń, liść), w kontekście ich działania przeciwutleniającego i przeciwzapalnego. Doprecyzowała także ich profile fitochemiczne w zakresie innych metabolitów wtórnych, istotnych dla efektu terapeutycznego bądź potencjału toksycznego i zagrożeń zdrowia (m.in. alkaloidy pirolizydynowe). Obecnie produkty z arniki i żywokostu aplikowane są głównie na skórę w celu leczenia stanów zapalnych tkanek położonych głębiej (mięśni i stawów), dlatego Doktorantka przedstawiła ocenę przenikania i absorpcji wybranych związków reprezentujących składniki z badanych grup chemicznych (kwas kawowy, kwas rozmarynowy, kwas chlorogenowy, helenalina), a także wyciągi z kwiatów arniki górskiej oraz korzeni i liści żywokostu w modelu niezwierzęcym *in vitro* przy użyciu syntetycznych błon wykonanych z estrów celulozy (*Spectra-Por Dialysis Membrane*) i polieterosulfonu (*Strat-M Membrane*). Wyniki z ostatnich eksperymentów mogą posłużyć do przewidywania biodostępności analizowanych substancji.

Recenzowana rozprawa doktorska składa się z czterech głównych części o układzie typowym dla prac doświadczalnych. Część pierwsza obejmuje omówienie aktualnego stanu wiedzy w zakresie badanych gatunków – arniki górskiej, arniki łąkowej i żywokostu lekarskiego, historii ich stosowania, składu chemicznego, aktywności farmakologicznej oraz obecności na rynku zielarskim/farmaceutycznym, a także stawianych w centrum badań oligomerycznych estrów kwasu kawowego w zakresie ich budowy, występowania i aktywności farmakologicznej. W drugiej części zostały przedstawione materiały i metody badawcze. W kolejnych częściach dysertacji Doktorantka przedstawiła i omówiła wyniki z przeprowadzonych badań fitochemicznych, oceny aktywności biologicznej oraz przenikania przez półprzepuszczalne syntetyczne błony imitujące skórę, podsumowała zebrane dane i wysunęła rozbudowane wnioski (1-14). Wobec tego rozdział IV „Wyniki i wnioski”, w przyjętym układzie powinien być w mojej opinii zatytułowany „Podsumowanie wyników i wnioski”, gdyż wyniki opisano wcześniej.

Poszczególne etapy rozprawy doktorskiej Pani Magister zrealizowała zgodnie z planem przez wykonanie prawidłowo wybranych i zaplanowanych doświadczeń, obejmujących badania farmakognostyczne, biologiczne i biofarmaceutyczne, w tym:

- opracowanie metod analizy jakościowej i ilościowej zespołu estrowych pochodnych kwasu kawowego oraz innych polifenoli (m.in. fenolokwasów i flawonoidów) z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w połączeniu z detektorem diodowym (DAD) i spektrometrem mas (MS), a także technik jedno- i dwukierunkowej chromatografii cienkowsarstwowej (1D i 2D TLC);
- identyfikację nowych związków z grupy estrowych pochodnych kwasu kawowego w badanych substancjach roślinnych metodami HPLC-DAD-ESI-MS i spektroskopowymi (1D- i 2D-NMR, ROESY, HSQC i HMBC), a także opracowanie metody ich izolacji (z korzenia żywokostu) z wykorzystaniem techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE);
- opracowanie metody badań innych metabolitów wtórnych istotnych dla aktywności biologicznej analizowanych surowców i ich przetworów, w tym metody TLC w połączeniu z densytometrią do oznaczeń zawartości alantoiny w przetworach z żywokostu lekarskiego; metody HPLC-MS/MS do rozpoznania składu i oznaczeń zespołu alkaloidów pirolizydynowych w korzeniach i liściach żywokostu; metody HPLC-DAD-ESI-MS i TLC do analizy laktonów seskwiterpenowych w przetworach z arniki górskiej i arniki łąkowej, a także rozpoznania zespołu laktonów seskwiterpenowych obecnych w nalewce macierzystej ze świeżej arniki górskiej;
- ocenę aktywności przeciwutleniającej (ABTS, DPPH, FRAP, hamowanie oksydazy ksantynowej) i przeciwzapalnej (COX-1 i 2,) *in vitro* podstawowych wyciągów oraz indywidualnych związków czynnych z korzeni i liści żywokostu lekarskiego oraz kwiatów arniki górskiej i arniki łąkowej;
- ocenę przenikania przez syntetyczne błony półprzepuszczalne (model niezwierzący) estrowych pochodnych kwasu kawowego, obok helenaliny i alkaloidów pirolizydynowych oraz ich ewentualnej absorpcji w kontekście dostępności biologicznej; badania prowadzono dla indywidualnych związków oraz przetworów z analizowanych surowców, w których były one zidentyfikowane.

Opracowane metody chromatograficzne Doktorantka wykorzystała do analizy porównawczej składu chemicznego korzeni i liści żywokostu oraz kwiatów arniki górskiej i arniki łąkowej pozyskanych w Polsce ze stanowisk naturalnych, ogrodów botanicznych, od dystrybutorów i bezpośrednio od wytwórców (producentów nalewki *Arnica* TM). W zakresie badań aktywności biologicznej oceniła *in vitro* działanie przeciwutleniające, jako element działania przeciwzapalnego, wyciągów metanolowych z korzeni i liści żywokostu, a także z kwiatów arniki górskiej i arniki łąkowej.

Potencjał biodostępności analizowało *in vitro* oceniając przenikanie składników powyższych wyciągów w odniesieniu do indywidualnych fenolokwasów (kwasu kawowego, kwasu rozmarynowego, kwasu chlorogenowego) i helenaliny, przez błony półprzepuszczalne imitujące ludzką skórę.

Cel pracy zakładający opracowanie skutecznych metod analizy jakościowej i ilościowej pochodnych estrowych kwasu kawowego, obok innych metabolitów wtórnych (alantoiny, alkaloidów pirolizydynowych i laktonów seskwiterpenowych) w substancjach i przetworach roślinnych z arniki górskiej, arniki łąkowej i żywokostu lekarskiego, porównanie ich profili fitochemicznych oraz ocenę aktywności przeciwutleniającej i przeciwzapalnej, a także przenikanie przez błony półprzepuszczalne mgr Katarzyna Kimel zrealizowała w pełni. Pomimo ukazania się w okresie realizacji rozprawy doktorskiej zbieżnych wyników innej grupy naukowców, prace Doktorantki dostarczyły nowych danych o badanych surowcach i przetworach oraz ich składnikach z grupy estrów kwasu kawowego. Opracowane profile fitochemiczne pozwoliły na poszerzenie wiedzy, w szczególności dla mniej znanych liści żywokostu lekarskiego i kwiatów arniki łąkowej.

W rezultacie Doktorantka opracowała szereg nowych metod chromatograficznych (1D-, 2D-TLC, MGD-TLC, TLC-bioautografia, HPLC-DAD-ESI-MS, HPLC-UV/Vis), które w toku prac zastosowała do rozpoznania składu chemicznego badanych roślin leczniczych. Proponowane metody uwierzytelniła w procesie walidacji przy użyciu rekomendowanych przez ICH testów. Metody te mogą być wykorzystane w analizie farmakognostycznej i farmaceutycznej materiału roślinnego w trakcie wytwarzania leków roślinnych, czy w analizie innych surowców o podobnym profilu chemicznym (np. gatunków z rodziny Boraginaceae i Asteraceae). Wyniki z przeprowadzonych badań poszerzyły także wiedzę o związkach z grupy estrów kwasu kawowego, występujących w surowcach pozyskiwanych z obu arnik i żywokostu. Doktorantka potwierdziła, zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, możliwy udział estrów kwasu kawowego w aktywności przeciwutleniającej i przeciwzapalnej, ale nie wykazała ich zdolności do penetracji błony półprzepuszczalnej imitującej ludzką skórę, co może sugerować ograniczoną biodostępności w zastosowaniu miejscowym. Potwierdziła także słabe przenikanie genotoksycznych i cytotoksycznych alkaloidów pirolizydynowych. W przeprowadzonych testach *in vitro* wyciągi z korzeni i liści żywokostu charakteryzowały się wyższym potencjałem hamowania COX-1 – izoforny uczestniczącej w utrzymaniu homeostazy organizmu w prawidłowych warunkach, w porównaniu do COX-2 aktywowanej w czasie reakcji zapalnej. Jednak wyciągi z liści cechowała niższa aktywność wobec COX-1 w porównaniu do wyciągów z korzeni. Ponadto Pani Magister wykazała duże różnice w jakości surowców handlowych, które niewątpliwie przekładają się na ich przydatność terapeutyczną. Odnotowane w niektórych próbkach korzeni żywokostu wysokie stężenia alkaloidów pirolizydynowych mogą stanowić zagrożenie zdrowotne, co skłoniło Ją do sformułowania słusznego

wniosku o konieczności kontroli ich zawartości także w surowcu dostępnym w obrocie pozaaptecznym.

Reasumując, zwięźczeniem badań przeprowadzonych przez mgr Katarzynę Kimel jest kilka ważnych osiągnięć naukowych:

1. Opracowanie nowych metod chromatograficznych (1D- i 2D-TLC, HPLC-DAD-ESI-MS) do analizy farmakognostycznej/farmaceutycznej estrów kwasu kawowego, flawonoidów i alkaloidów pirolizydynowych w korzeniu i liściu żywokostu; opracowanie metody TLC z oznaczeniem densytometrycznym do analizy zawartości alantoiny w przetworach z żywokostu lekarskiego; w korzeniu żywokostu Doktorantka potwierdziła obecność estrów kwasu kawowego (globoidnanów A i B, rabdozyny, kwasu rozmarynowego i kwasu kawowego); w liściu żywokostu po raz pierwszy ujawniła występowanie szeregu glikozydów flawonoidowych – glukozydów, galaktozydów i malonylo-glukozydów kwercetyny i kemferolu oraz globoidnanu A obok kwasu rozmarynowego i kwasu kawowego; odnotowała znaczące różnice w profilach fitochemicznych korzeni i liści żywokostu (analiza chemometryczna); po raz pierwszy scharakteryzowała skład i zawartość alkaloidów pirolizydynowych w liściach żywokostu (ogólnie niższa zawartość, brak *N*-tlenku 3'-acetylosymfityny lub jego izomerów, przewaga intermedyny, likopsaminy i ich *N*-tlenków).
2. Opracowanie nowych metod chromatograficznych (1D- i 2D-TLC, MGD-TLC, HPLC-ESI-ESI-MS) do analizy farmakognostycznej/farmaceutycznej estrów kwasu kawowego, flawonoidów i laktonów seskwiterpenowych w kwiatach arniki górskiej i arniki łąkowej oraz nalewkach ze świeżego ziela arniki z korzeniem; opracowanie metody SPE w systemie automatycznym do rozdzielania polifenoli od laktonów seskwiterpenowych; Pani Magister wykazała różnice w składzie chemicznym kwiatów arniki górskiej i arniki łąkowej; w nalewce macierzystej z arniki górskiej (*Arnica* TM) po raz pierwszy określiła profil związków fenolowych; ujawniła obecność, niewykrytych w kwiatach arnik metabolitów m.in. kwasu trikawoilochinowego oraz 6-metoksyapigeniny, przy braku 7-*O*-glukozydu luteoliny, 3-*O*-glukozydu 6-metoksykemferolu i 7-*O*-glukozydu apigeniny; w wyciągu z kwiatów arniki łąkowej odnotowała obecność patuletyny, 6-metoksykemferolu i kwercetyny, niewykrytych w kwiatach arniki górskiej; w zespole związków fenolowych wykazała dominację kwasów dikawoilochinowych; w nalewce *Arnica* TM po raz pierwszy rozpoznała laktony seskwiterpenowe – helenalinę, metakrylan dihydrohelenaliny, acetylodihydrohelenalinę, metakrylan helenaliny, izomaślan helenaliny, izomaślan dihydrohelenaliny, tyglinian dihydrohelenaliny, tyglinian helenaliny, 2-metylomaślan dihydrohelenaliny, 2-metylomaślan helenaliny, walerianian dihydrohelenaliny i walerianian helenaliny.

3. Dla estrów kwasu kawowego (kwasu rozmarynowego i globoidnanu A) potwierdziła aktywność przeciwutleniającą (ABTS, DPPH, FRAP oraz TLC-bioautografia z użyciem DPPH) oraz zdolność hamowania aktywności oksydazy ksantynowej (XO); ujawniła, że globoidnan A może być selektywnym inhibitorem XO; wykazała wyższą aktywność przeciwrodnikową kwiatów arniki górskiej w porównaniu do kwiatów arniki łąkowej, prawdopodobnie z uwagi na wyższe zawartości estrów kwasu kawowego.
4. Wykazała wysoki stopień przenikania przez błonę celulozową kwasu kawowego i jego estrów (powyżej 72%) obecnych w wyciągu z korzeni żywokostu oraz niższą dla wyciągu z liści żywokostu (48%); nie potwierdziła natomiast ich zdolności do przenikania przez membranę Strat-M, zarówno w odniesieniu do indywidualnych związków jak i naturalnych mieszanin - wyciągów; wykazała absorpcję w warstwach Strat-M kwasu kawowego (54% z korzenia żywokostu i 8% z liścia żywokostu), rozmarynowego (4% i 1%, odpowiednio) i chlorogenowego (0,7% z kwiatu arniki górskiej) ale nie globoidnanu A; potwierdziła przenikanie przez błonę Strat-M helenaliny na poziomie ok. 25%, jednak nie odnotowała helenaliny w płynie akceptorowym po zastosowaniu wyciągu z kwiatu arniki górskiej, ze względu na jej niskie stężenie w przetworze; potwierdziła także przenikanie na bardzo niskim poziomie *N*-tlenków intermedyny i likopsaminy, oraz absorpcję w Strat-M wolnych form intermedyny i likopsaminy oraz ich *N*-tlenków (0,4% i 0,1%).

W podsumowaniu osiągnięć mgr Katarzyny Kimel uwzględniłam monografię i publikacje wskazane przez ich Autorkę jako składowe rozprawy doktorskiej. W mojej opinii powyższe prace są bardzo wartościowe i wnoszą istotny wkład w rozwój badań nad metabolitami wtórnymi substancji roślinnych z gatunków *A. montana*, *A. chamissonis* i *S. officinale*, ich potencjałem leczniczym i biodostępnością, szczególnie w odniesieniu do pochodnych estrowych kwasu kawowego. Opracowano je w sposób odpowiedni dla prac badawczych, z zachowaniem zasad rzetelności naukowej oraz uwzględniając istotę podjętej tematyki. Doktorantka skrupulatnie udokumentowała przeprowadzone doświadczenia, zamieszczając liczne ryciny z chromatogramami i widmami oraz tabele, wzory strukturalne i szlaki fragmentacji jonów pseudomolekularnych.

Do obowiązków recenzenta należy również omówienia zauważonych nieścisłości czy uchybień w przekazanych do oceny pracach. Zasadniczo monografię charakteryzuje dobry styl, choć Autorka nie uniknęła drobnych błędów edytorskich i w tłumaczeniu, oto kilka przykładów: na str. 125 dysertacji dla akronimu NMR zastosowała rozwinięcie „magnetycznego rezonansu nuklearnego” zamiast magnetycznego rezonansu jądrowego; na str. 126, strukturę globoidnanu A opisała jako „lignan trimeru kwasu kawowego ” - przypuszczalnie opis dotyczy trimeru kwasu kawowego o strukturze lignanu; za str. 158, cytuję „w strukturze bocznego fenylu” - prawdopodobnie informacja dotyczy

pierścienia fenylowego B flawonoidów. Pewien problem stanowi także brak ujednoliconej prezentacji danych dotyczących zawartości związków. W tabelach 11, 12, 20 i przy omawianiu odpowiednich wyników (powiązane strony) należało ilości oznaczonych związków przedstawiać w zaokrągleniu do drugiego miejsca po przecinku, analogicznie jak w tabeli 16 lub do wartości znaczącej, jednak wyłącznie do setnych części jak w tabeli 21, co ułatwiłoby czytającemu ich porównanie. Natomiast wartości bardzo niskie, jak w tabeli 17, z tych samych powodów warto było przedstawić w innych jednostkach, np. $\mu\text{g/g}$ (zamiast mg/g). Podobnie w dalszych tabelach także obejmujących wyniki z badań *in vitro*. Kolejna uwaga wiąże się z przedstawianiem zawartości na jednostkę masy – w niektórych analizach były wyrażone na 1 g s.m. w innych na 100 g s.m. (lub 100 mL nalewki). Zalecałabym w przyszłości unikania zwrotów wywodzących się z języka angielskiego, a postrzeganych jako żargon laboratoryjny, np. „izolat” (Ryc.33) zamiast związek/substancja izolowana/wydzielona/wyodrębniona, czy „wymiatanie wolnych rodników”. Niejasne wydaje się także użycie terminu dostępności farmaceutycznej w odniesieniu do testów przenikania przez półprzepuszczalne błony syntetyczne. Prosiłabym o odniesienie się do tej kwestii.

Kończąc ocenę dodam, iż powyższe uwagi mają jedynie charakter porządkujący i nie wpływają na ogólnie wysoką wartość naukową monografii i publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, które spełniają wszystkie wymagania formalne i merytoryczne stawiane w dyscyplinie nauk farmaceutycznych. Przedstawione osiągnięcia świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu mgr Katarzyny Kimel do prowadzenia dalszych prac badawczo-rozwojowych. W czasie studiów doktorskich Pani Magister posiadała umiejętność samodzielnego planowania i systematycznej realizacji eksperymentu naukowego. Wykazuje przy tym bardzo dobre zrozumienie zagadnień teoretycznych, znajomość technik analitycznych oraz metod badań farmakognostycznych i farmaceutycznych. Potrafi przedstawić, podsumować i krytycznie omówić wyniki własnych badań w odniesieniu do aktualnego piśmiennictwa z dziedziny nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

Wnioski końcowe

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską, z uwagi na jej istotny wkład naukowy i wartość poznawczą, a w odniesieniu do wyników z analizy porównawczej także praktyczną, oceniam bardzo wysoko. Przekazuję tym samym wyrazy uznania Doktorantce i Promotorom - Pani Profesor Mirosławie Krauze-Baranowskiej i Pani Profesor Małgorzacie Sznitowskiej.

W świetle powyższej, pozytywnej oceny stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Kimel spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane w art. 186 i 187 Ustawy z dn. 3 lipca 2018 r.

Wrocław, 10.11.2023 r.

Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018, poz. 1669 ze zm.).

Na tej podstawie **wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o jej przyjęcie i dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Kimel do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauk farmaceutycznych.**

Aktywność i zaangażowanie w pracę naukową Doktorantki oraz Jej osiągnięcia naukowe zasługują w moim przekonaniu na wyróżnienie, dlatego **kieruję drugi wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Kimel.**

Prof. dr hab. n. farm. Izabela Fecka