



UMCS

UNIwersYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE
Wydział Chemii

dr hab. Irena Maria Choma, prof. UMCS
Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chromatografii

Lublin, 05.11.2023

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ PANI MGR KATARZYNY KIMEL

pt.

**BADANIA ESTRÓW KWASU KAWOWEGO W NIEKTÓRYCH GATUNKACH Z RODZAJU
SYMPHYTUM I *ARNICA* Z OCENĄ *IN VITRO* AKTYWNOŚCI PRZECIWPALNEJ
ORAZ DOSTĘPNOŚCI FARMACEUTYCZNEJ**

Recenzja wykonana na wniosek Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 24.10.2023 r.

Praca doktorska wykonana w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Katedry Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem naukowym promotorki Pani prof. dr hab. n. farm. Mirosławy Krauze-Baranowskiej oraz promotorki pomocniczej Pani prof. dr hab. n. farm. Małgorzaty Sznitowskiej. Praca obejmuje zarówno wyniki dotychczas nieopublikowane jak i zawarte w czterech pracach eksperymentalnych oraz dwóch przeglądowych o łącznym IF: 7,286 i punktacji MEiN: 440, opublikowanych zarówno w czasopismach polskich jak i zagranicznych.

Praca została zrealizowana przy wsparciu projektu: "Interdyscyplinarny program studiów doktoranckich jako narzędzie kształcenia kadr dla nauki i gospodarki w obszarze profilaktyki i terapii chorób cywilizacyjnych" PO WER.03.02.00-IP.08.00-DOK/16. Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.



FORMALNA OCENA PRACY

Przedstawiona do recenzji dysertacja doktorska dotyczy badania estrów kwasu kawowego w niektórych gatunkach *Symphytum* i *Arnica*, a także oceny aktywności przeciwzapalnej oraz dostępności farmaceutycznej. Praca liczy 270 stron, zawiera 65 rycin i 32 tabele, opiera się na 236 pozycjach literaturowych. Składa się z:

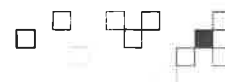
1. Celu pracy
2. Części teoretycznej
3. Części doświadczalnej
4. Badań własnych
5. Podsumowania wyników i wniosków
6. Streszczenia w języku polskim i angielskim
7. Bibliografii
8. Spisu ilustracji i spisu tabel

Dodatkowo zamieszczono spis treści, wykaz publikacji własnych oraz wystąpień ustnych i sesji plakatowych na konferencjach krajowych i międzynarodowych oraz spis skrótów użytych w pracy.

MERYTORYCZNA OCENA PRACY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy badań nad zespółami estrów pochodnych kwasu kawowego obecnych w surowcach z wybranych gatunków z rodzaju *Arnica* (*Arnica montana* L., *Arnica chamissonis* Less.) i *Symphytum officinale* L., w kontekście ich działania przeciwutleniającego/przeciwzapalnego. Ponadto przedstawiono wyniki analizy fitochemicznej innych obecnych w wymienionych surowcach metabolitów wtórnych oraz zbadano dostępność farmaceutyczną wybranych substancji biologicznie czynnych.

Surowce roślinne otrzymanywane z w/w gatunków, od wieków stosowane w polskiej i europejskiej medycynie tradycyjnej, są składnikami wielu preparatów farmaceutycznych. Ostatnio nie rekomenduje się ich użycia wewnętrznego, ze względu na działania niepożądane wykazywane przez laktony seskwiterpenowe w arnice oraz alkaloidy pirolizydynowe w żywokoście lekarskim. Nadal jednak są szeroko stosowane w aplikacjach zewnętrznych m.in. w leczeniu schorzeń reumatycznych i układu mięśniowo-szkieletowego.



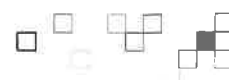
CEL PRACY został przedstawiony jasno, z uwzględnieniem celu głównego i pięciu celów cząstkowych, których realizacja doprowadziła do osiągnięcia zasadniczego zadania, czyli rozpoznania zespołów estrów pochodnych kwasu kawowego w substancjach roślinnych czynnych pozyskiwanych z gatunków *Arnica montana* L., *A. chamissonis* Less. i *Symphytum officinale* L. oraz oceny ich dostępności farmaceutycznej z określeniem udziału w aktywności antyoksydacyjnej/przeciwzapalnej wobec innych metabolitów wtórnych.

W CZĘŚCI TEORETYCZNEJ pracy, liczącej 47 stron znajduje się pasjonujący przegląd zagadnień, oparty na doniesieniach literaturowych, dotyczący podjętych przez Autorkę zagadnień. Część ta składa się z trzech rozdziałów podzielonych na szczegółowe podrozdziały. Dwa pierwsze rozdziały dotyczą badanych roślin tj. żywokostu lekarskiego oraz arniki górskiej i łąkowej. Omówione zostały stanowiska systematyczne, występowanie, charakterystyka botaniczna, historia zastosowań leczniczych, skład chemiczny, działanie lecznicze i jego mechanizmy oraz produkty lecznicze tych roślin. Dodatkowo, w przypadku żywokostu omówiono ograniczenia związane z jego toksycznością. Trzeci rozdział części teoretycznej dotyczy estrów kwasu kawowego tj. kawoilotanin oraz kwasów kawoilochinowych: ich budowy, występowania, aktywności biologicznej i mechanizmu działania.

Teoretyczna część pracy napisana jest w sposób logiczny i interesujący. Z całą pewnością świadczy to o dobrym przygotowaniu teoretycznym do prowadzenia podjętych przez Doktorantkę badań oraz o umiejętności korzystania z literatury. Należy też podkreślić, iż Pani mgr Kimel jest współautorką dwóch prac przeglądowych nt. skuteczności i bezpieczeństwa stosowania korzenia żywokostu lekarskiego oraz znaczenia leczniczego Arniki górskiej opublikowanych odpowiednio w *Postęпах Fitoterapii* i *Farmacji Polskiej*.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA, bardzo szczegółowa i rozbudowana (str. 72-103) zawiera:

1. Wykaz aparatury, sprzętu laboratoryjnego, rozpuszczalników i odczynników chemicznych.
2. Opis analizy chromatograficznej TLC i HPLC: komory TLC (klasyczne i automatyczne), systemy HPLC (UV-VIS, DAD-ESI-MS, MS/MS), płytki, kolumny, fazy ruchome, sposoby elucji i detekcji.
3. Metody ekstrakcji materiału roślinnego oraz oczyszczenia.



4. Opis analizy jakościowej i ilościowej TLC (jedno- i dwukierunkowej) oraz HPLC, warunki rozdzielania i walidację.
5. Metody badania aktywności biologicznej: przeciwutleniającej i przeciwzapalnej.
6. Analizę statystyczną.
7. Badanie dostępności farmaceutycznej.

CZĘŚĆ III (BADANIA WŁASNE) podzielona jest na

1. analizę korzenia i liścia żywokostu oraz
2. analizę arniki górskiej i łąkowej.

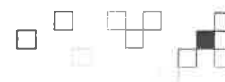
Ad. 1. Przeprowadzono

- jakościową i ilościową analizę chromatograficzną TLC z densytometrią dla alantoiny,
- jakościową analizę zespołu polifenoli metodami TLC oraz HPLC,
- ilościową, zwalidowaną analizę HPLC-DAD zespołu polifenoli,
- ilościową, zwalidowaną analizę HPLC-MS/MS alkaloidów pirolizydynowych wraz z analizą czynnikową dystrybucji tych alkaloidów w korzeniu i liściu żywokostu,
- oznaczenie aktywności biologicznej w/w wyciągów metodami spektroskopii UV-VIS z analizą statystyczną oraz za pomocą TLC-bioautografii (test DPPH, ryboflawina-światło-NBT, hamowanie oksydazy ksantynowej),
- oznaczenie aktywności przeciwzapalnej w/w wyciągów i kwasu rozmarynowego – aktywności hamującej cyklooksygenazę-1 i -2.

Ad. 2. Przeprowadzono:

- jakościową i ilościową analizę chromatograficzną HPLC-DAD-ESI/MS związków polifenolowych i prostych fenoli oraz laktonów seskwiterpenowych (tu porównanie z TLC) w kwiatach i nalewkach z arniki górskiej i łąkowej,
- oznaczenie aktywności biologicznej w/w wyciągów metodami spektrofotometrycznymi (ABTS i FRAP) oraz TLC-bioautografią (test DPPH, ryboflawina-światło-NBT, hamowanie oksydazy ksantynowej).

Dodatkowo zbadano dostępność farmaceutyczną estrów pochodnych kwasu kawowego oraz helenaliny i alkaloidów pirolizydynowych.



Postawione przez Autorkę cele pracy zostały w pełni zrealizowane:

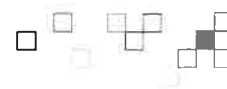
Opracowano szereg metod chromatograficznych (zarówno TLC jak i HPLC), które posłużyły do rozpoznania składu chemicznego badanych surowców, w tym słabo poznanych liści żywokostu i nalewek z całej świeżej rośliny *A. montana*, w zakresie związków polifenolowych oraz metabolitów wtórnych – alantoiny i alkaloidów pirolizydynowych w żywokoście oraz laktonów seskwiterpenowych w dwóch gatunkach arniki. Po raz pierwszy zbadano zespół flawonoidów oraz kwasów fenolowych z nalewki z całej świeżej rośliny *A. montana* wykazując różnice w składzie chemicznym w porównaniu do wysuszonych kwiatów arniki. Opracowane metody mogą być przydatne w dalszych analizach składu chemicznego badanych surowców roślinnych oraz wymienionych grup związków biologicznie czynnych w innych matrycach roślinnych.

Potwierdzono możliwy udział estrów pochodnych kwasu kawowego w aktywności przeciwutleniającej/przeciwzapalnej; nie wykazano jednak ich zdolności do penetracji przez błony półprzepuszczalne imitujące ludzką skórę, co może świadczyć o słabej dostępności farmaceutycznej badanych związków.

Objęcie badaniami surowców krajowych pozyskanych ze sklepów zielarskich, stanowisk naturalnych i ogrodów botanicznych, wraz z analizą statystyczną, pozwoliło na wykazanie znaczących różnic w ich składzie ilościowym oraz aktywności biologicznej, zwłaszcza w wypadku liści i korzeni żywokostu lekarskiego. Obserwowane różnice w jakości i potencjalnym bezpieczeństwie (alkaloidy pirolizydynowe) obecnych na rynku zielarskim surowców roślinnych stanowią wezwanie do rozszerzenia badań oraz zwiększenia kontroli jakości. Należy również jak najszybciej podjąć prace nad standaryzacją surowców roślinnych.

Z obowiązku recenzenta jestem zmuszona zgłosić następujące uwagi:

1. Brakuje IF i liczby punktów ministerialnych w odniesieniu do sześciu prac własnych.
2. Brakuje oznaczenia tych prac, np. (Kimel 5), (Kimel 50), (Kimel 99), (Kimel 110). Brak takiego wyróżnienia utrudnia znalezienie ich wśród cytowanych prac.
3. Błąd w numeracji/poziomach spisu treści.
4. Ryc. 26. Czy dla lewej połowy płytki zastosowano detekcję w 366 nm bez derywatyzacji?
5. Ryc. 38. Nie ma opisu punktów 1-9.
6. Ryc. 47. Co jest oznaczone czarną a co niebieską linią?



7. Ryc. 58 i 59 – te same podpisy pod rysunkiem.
8. Str. 190 Nie widzę „Żółtej fluorescencji pasma globoidnanu A (9) w teście hamowania oksydazy ksantynowej”.
9. Str. 112 Tajemnicze zdanie: **(Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania.)**.

Muszę podkreślić, że powyższe uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, zwłaszcza że praca napisana jest eleganckim językiem, praktycznie bez błędów, nawet literowych. Przeprowadzone badania, ich zakres oraz sposób ich prezentacji świadczą zarówno o poziomie naukowym Doktorantki jak i Jej predyspozycjach naukowych.

Część teoretyczna pracy wykazała bardzo dobre przygotowanie mgr Katarzyny Kimel do prowadzenia badań oraz interpretacji otrzymanych wyników, część doświadczalna potwierdziła te predyspozycje, a zwłaszcza szczególnie cenną umiejętność wyciągania wniosków na poszczególnych etapach pracy i formułowania nowych zadań na ich podstawie, aby w rezultacie osiągnąć cel postawiony na początku pracy. Realizacja celu postawionego przez Doktorantkę wymagała ogromnej pracy eksperymentalnej i umiejętności posługiwania się różnymi technikami. Badania cechują się oryginalnością, nowatorstwem oraz mogą mieć praktyczne zastosowanie. Bardzo dobrze, szczegółowo i logicznie sformułowano wnioski końcowe.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Kimel spełnia wymagania określone w art. 186 i art. 187 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. 2021, Poz. 478) ponieważ zawiera oryginalne rozwiązania postawionego problemu naukowego, wskazuje na posiadanie przez Autorkę wymaganej wiedzy teoretycznej i możliwości jej samodzielnego praktycznego wykorzystania. W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Kimel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na aktualność tematyki badawczej, wysoki poziom prowadzonych badań i wartość uzyskanych wyników składam wniosek o wyróżnienie niniejszej Rozprawy.

Dr hab. Irena Choma, prof. UMCS

