



Prof. dr hab. Wiesława Bylka
Katedra i Zakład Farmakognozji
Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego
im K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2 maja 2016

**Ocena pracy doktorskiej mgr Karoliny Grabowskiej
„Analiza fitochemiczna i ocena aktywności biologicznej wyciągów
oraz wybranych metabolitów z *Impatiens parviflora* DC.”**

Niecierpek drobnokwiatowy (*Impatiens parviflora* DC.) jest szeroko rozpowszechnioną rośliną inwazyjną, której skład chemiczny i aktywność farmakologiczna została dotąd słabo poznana. Nie budzi zatem zastrzeżeń aspekt chemiczno-biologiczny pracy, której przedmiotem były zarówno organy nadziemne (liście, łodygi) jak i korzenie niecierpka drobnokwiatowego. Z analizowanych surowców (suszonych i świeżych) otrzymano wyciągi zawierające związki lipofilne oraz ekstrakty, w których skład wchodziły związki hydrofilne. Wobec małej liczby dotąd przeprowadzonych badań nad *I. parviflora*, warto było sprawdzić obecność związków z różnych grup chemicznych: flawonoidów, saponozydów, fenoli, kumaryn, triterpenów, leukoantocyjanidyn, karotenoidów, naftochinonów, steroli, oraz glikoglicerolipidów. Prace izolacyjne miały na celu otrzymanie związków z wybranych trzech grup: flawonoidów, saponozydów i glikoglicerolipidów. Zakres zaplanowanych badań biologicznych, które wykonano w warunkach *in vitro*, obejmował ocenę aktywności: antyoksydacyjnej, przeciwzapalnej, hamującej hialuronidazę, przeciwdrobnoustrojowej, cytotoksycznej wybranych wyciągów i otrzymanych metabolitów.

Część teoretyczna pracy zawiera charakterystykę fitochemiczną badanego gatunku i innych gatunków z rodzaju *Impatiens*. Autorka szczegółowo przedstawiła wyniki wcześniejszych prac, dotyczących wykrytych związków oraz wykazanej aktywności farmakologicznej, w większości przedstawiając je w tabelach, co nadaje tej części pracy zwięzłego charakteru. Przegląd stanu badań nad rodzajem *Impatiens* pomógł Doktorantce w wytyczeniu kierunków

prac własnych oraz w weryfikacji stanu wiedzy na temat analizowanego gatunku, a także w jej poszerzeniu.

W celu stwierdzenia obecności związków z różnych grup chemicznych Doktorantka posłużyła się analizą TLC w 3-4 standardowych fazach, substancjami wzorcowymi i odpowiednimi odczynnikami do wizualizacji oraz metodą HPLC do analizy kwasów fenolowych i flawonoidów. Wynikiem prac było wykrycie obecności β -amyryny, β -sitosterolu, izokwercytryny, luteoliny, kemferolu, hiperozydu, kwasów fenolowych: kawowego, chlorogenowego, izochlorogenowego, galusowego, oraz β -karotenu, skopoletyny, umbeliferonu, oraz związków z grup: glikoglicerolipidów, saponozydów, niezidentyfikowanego flawonoidu, przy braku naftochinonów. Większość stwierdzonych powyższymi metodami związków wykryto po raz pierwszy, inne potwierdzono gdyż były opisywane w *I. parviflora* przez innych Autorów.

Do prac izolacyjnych wybrano flawonoidy, glikoglicerolipidy oraz saponozydy. Wyodrębnianie jednorodnych związków Doktorantka wykonała stosując różne techniki: średniociśnieniową chromatografię cieczową, chromatografię kolumnową i preparatywną cienkowarstwową, w dobranych eksperymentalnie fazach ruchomych. Prace zakończyły się pełną identyfikacją dwóch saponozydów IPS-1 oraz IPS-2 (monodesmozydy, z trzema cukrami prostymi pochodne: kameliageniny A i acetylokameliageniny A), oba związki nowe w świecie roślinnym. Związki zostały wyodrębnione w ilościach pozwalających na szereg analiz, które wykonano (wysokorozdzielcza spektrometria mas HR-ESI-MS, magnetyczny rezonans jądrowy ^1H , ^{13}C NMR, 2DNMR (HSQC, COSY, TOCSY, HMBC, ROESY). Widma są wnikliwie opisane i prawidłowo zinterpretowane, w oparciu o dane literaturowe związków o zbliżonych strukturach, dobrze udokumentowane w tabelach i na rycinach. Szczególną trudnością było ustalenie sekwencji cukrów prostych w podstawniku cukrowym, którą udowodniła poprzez przeprowadzenie analizy widm 2D NMR, szczególnie korelacji dalekiego zasięgu oraz analizę fragmentacji w widmie masowym uzyskanym techniką tandemowej spektrometrii mas. W tej części pracy zwraca uwagę biegłość Doktorantki w interpretacji widm.

Prace izolacyjne związków z grupy galaktoglicerolipidów doprowadziły do otrzymania MGDG -1 i DGDG-1, które identyfikowała metodami ESI-MS oraz ^1H i ^{13}C NMR. Analiza fragmentacji w widmie MS i wartości charakterystycznych przesunięć w widmach NMR, w oparciu o dane literaturowe, pozwoliły ustalić, że związki są mono- i digalaktoglicerolipidami, w których dwie cząsteczki OH glicerolu są zestrefikowane kwasem

α -linolenowym. Związki te są znane w świecie roślinnym, ale w *I. parviflora* nie były dotąd wykryte.

Flawonoid IPF-1 również identyfikowany techniką MS i NMR, okazał się 3-*O*-glukozydem kemferolu, wcześniej opisanym w badanym gatunku.

Przesłanką do podjęcia badań nad działaniem przeciwzapalnym, cytotoksycznym, przeciwdrobnoustrojowym, antyoksydacyjnym badanego gatunku, była aktywność innych gatunków niecierpka w ww. kierunkach. Do badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro*, pozwalających na szybką ocenę, wytypowano niektóre wyciągi i wyodrębnione związki: galaktoglicerolipidy MGDG -1 i DGDG -1 oraz saponozyd IPS-1, w większości nie były one analizowane w założonym zakresie.

Działanie przeciwzapalne wyciągów okazało się znaczne, lecz słabsze od wzorcowego diklofenaku, związków niewielkie, badane próby nie działały przeciwdrobnoustrojowo wobec 10 wzorcowych szczepów (ze względu na brak nafochinonów, którym przypisuje się aktywność przeciwdrobnoustrojową), wykazywały zróżnicowaną aktywnością cytostatyczną wobec komórek dwóch linii nowotworu prostaty, trzech linii czerniaka. Mimo słabego działania przeciwnowotworowego, istotny był brak toksyczności na prawidłowe komórki nabłonka prostaty i fibroblasty skóry ludzkiej. Aktywność antyoksydacyjna wyciągów oceniana metodami FRAP i DPPH była zróżnicowana, dla niektórych wyciągów skorelowana z zawartością polifenoli, w innych zależała od obecnych w ekstraktach związków lipofilnych, natomiast związki odznaczały się słabą aktywnością antyoksydacyjną.

Jedną z ważnych aktywności surowców roślinnych jest hamowanie hialuronidazy, enzymu którego nadmierna aktywność powoduje zwiększenie przepuszczalności ścian naczyń krwionośnych, rozwój stanu zapalnego. Do podjęcia badań skłoniła Autorkę aktywność innych pochodnych kameliasaponiny A, natomiast w odniesieniu do wyciągów niecierpka oraz MGDG-1 i DGDG-1 badania takie nie były prowadzone. Wyniki okazały się bardzo interesujące, bowiem stwierdzono, że galaktoglicerolipidy, charakteryzowały się wyraźną dawkozależną zdolnością hamowania hialuronidazy, szczególnie MGDG-1, działający silniej niż kwercetyna. Aktywność tą stwierdzano też dla wyciągów zawierających związki o charakterze lipofilnym oraz dla hydrofilnych ekstraktów, w tym przypadku z powodu obecności flawonoidów i saponin (IPS-1 działał nieco silniej od związku referencyjnego).

Uwagi są nieliczne:

W celu wizualizacji związków flawonoidowych czułym odczynnikiem i przyjętym w analityce związków z tej grupy jest ester aminoetylowy kwasu difenyloborowego (Naturstoffreagenz A), natomiast kwasy fenolowe dają barwne reakcje ze zdwuazowanym

kwasem sulfanilowym w środowisku alkalicznym, a obserwowana zróżnicowana fluorescencja i barwa pozwala na wstępne rozróżnienie.

Nieprecyzyjnym sformułowaniem, które można zakwestionować, jest hydroliza kwaśna, zamiast hydroliza kwasowa.

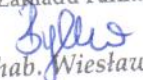
Praca ma klasyczny układ, podzielona jest na rozdziały, z wydzieleniem części teoretycznej zajmującej około 25% i doświadczalnej, krytyczną dyskusją otrzymanych wyników na tle literatury, podsumowaniem wraz z wnioskami oraz suplementem zawierającym ryciny wykonanych widm. Imponująca jest liczba doniesień literaturowych (369 pozycji), z których Autorka korzystała w opracowaniu dysertacji.

Maszynopis rozprawy jest zredagowany wyjątkowo starannie, błędy gramatyczne są bardzo nieliczne. Praca jest napisana w bardzo zwięzły i zrozumiały sposób, poprawny stylistycznie.

Aspekt chemiczno-biologiczny wykonanych badań, z dużym nakładem pracy Autorki i znajomością różnych technik badań biologicznych, zgodny jest z nurtem aktualnie prezentowanym w pracach z dziedziny farmakognozji. O dobrej randze naukowej recenzowanej pracy świadczy opublikowanie fragmentu wykonanych badań przez międzynarodowe czasopismo naukowe ze wskaźnikiem IF.

Doktorantkę cechuje umiejętność zaplanowania i prowadzenia pracochłonnych doświadczeń naukowych, a także dyskutowania i oceny wyników badań własnych. Rezultaty prac przeprowadzonych w rozprawie doktorskiej, stanowią istotny wkład w poznanie składu metabolitów wtórnych oraz wybranych kierunków aktywności biologicznej niektórych wyciągów i związków *I. parviflora*.

Oceniam, że recenzowana praca prezentuje wysoki poziom naukowy i spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk farmaceutycznych, wnioskuję zatem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Karoliny Grabowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Katedry i Zakładu Farmakognozji

Prof. dr hab. Wiesława Byłka