

Ocena

Pracy doktorskiej mgr Karoliny Grabowskiej pod tytułem „Analiza fitochemiczna i ocena aktywności biologicznej wyciągów oraz wybranych metabolitów z *Impatiens parviflora* DC.” wykonanej w Katedrze Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum

Wtórne metabolity roślinne przez długi okres uważane były za odpadowe ogniwo metabolizmu podstawowego. Od pewnego jednak czasu, dzięki postępowi w analityce tych związków istnieje coraz więcej dowodów, że substancje te są tak samo ważne dla rośliny jak związki metabolizmu podstawowego i są miarą dopasowania organizmu do warunków środowiska. Z drugiej strony większość z tych metabolitów uznawano za substancje antyżywniowe lub wręcz naturalne toksyny, a hodowla nowych odmian ukierunkowana była na ich eliminację z roślin uprawnych. Znakomitymi przykładami mogą być glukozynolany w roślinach krzyżowych, alkaloidy w łubinie, glikoalkaloidy ziemniaka czy taniny bobiku. Eliminacja tych związków z roślin spowodowała w wielu przypadkach obniżenie ich odporności na stresy środowiskowe. Jednocześnie liczne prace dokumentowały, że w niskich stężeniach substancje te wykazują prozdrowotne działanie w organizmie człowieka, co zaowocowało dynamicznie rozwijającym się rynkiem wzbogacania żywności substancjami wtórnego metabolizmu tzw. nutraceutyki. Jednakże rynek ten pomimo swojego bogactwa ofert wydaje się posługiwać zaledwie kilkunastoma gatunkami roślin, spośród których najbardziej popularne to jeżówka, żeńszeń, czosnek, dziurawiec czy miłorząb japoński. Gatunki te należą również do najpopularniejszych z uwagi na działanie lecznicze i są najczęściej stosowane w terapii.

Z drugiej strony, znacznie starsze były zastosowania metabolitów wtórnych do leczenia różnych schorzeń. Dzięki badaniom entnobotanicznym udało się opracować szereg popularnych leków jak aspiryna, atropina, kamfora, efedryna, eugenol, chinina itp. Ale jak podają różne źródła wciąż na kuli ziemskiej istnieje około 300 tysięcy gatunków roślin, które nigdy nie były badane i ich skład chemiczny nie jest poznany. Są to gatunki, które nie są popularnie wykorzystywane przez człowieka, ale mogą zawierać związki o aktywności biologicznej dotychczas nie określonej, mogące być wykorzystane bezpośrednio w leczeniu lub służyć jako modele lub substraty do syntezy chemicznej. Dlatego też badania gatunków roślin, które dotychczas nie są dobrze scharakteryzowane fitochemicznie, należą do uzasadnionych i priorytetowych. Stąd moim zdaniem wybór tematu i gatunku rośliny prezentowanej w ocenianej dysertacji należy uznać za uzasadniony.

Przedłożona do oceny praca doktorska obejmuje 229 stron maszynopisu; zawiera 58 tabel, 87 rycin, oraz 369 pozycji cytowanej literatury.

Badania własne Doktorantka poprzedziła wprowadzeniem czytelnika w opracowany dokument. Dla łatwości czytania przedstawiła najpierw wykaz stosowanych w pracy skrótów, a następnie w krótkim wprowadzeniu przedstawiła opis gatunku i stan wiedzy na jego temat, aby następnie zaproponować cel i założenia podjętych badań. Ponieważ szereg gatunków rodzaju *Impatiens* wykazuje aktywność przeciwzapalną, cytostatyczną, przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą i insektobójczą, postanowiła przebadać pod tym względem gatunek *Impatiens parviflora* DC., mało pod tym względem rozpoznany. Widzę w takim postępowaniu dużą logikę i konsekwencję myślenia.

Część teoretyczna pracy obejmuje 48 stronicowy przegląd literatury. Został on podzielony na trzy główne bloki tematyczne. Na wstępie Doktorantka przedstawiła opis różnych cech inwazyjnego gatunku *Impatiens parviflora* DC., który był przedmiotem badań, by następnie przedstawić informację na temat innych gatunków z tego rodzaju, które zostały dobrze opisane w literaturze. Ta część pozwala się czytelnikowi zorientować jakie jest znaczenie rodzaju *Impatiens* w lecznictwie, co wiadomo na temat składu fitochemicznego gatunków i aktywności biologicznej ekstraktów i wyodrębnionych związków, oraz jak na tle ogólnej wiedzy o rodzaju przedstawiają się dane dostępne dla *I. parviflora*. Trzecia część przeglądu literatury dotyczy dwóch grup metabolitów wtórnych tj. saponin triterpenowych i galaktoglicerolipidów, będących przedmiotem poszukiwań w *I. parviflora*. W opisie podano informacje ogólne, oparte na badaniach różnych rodzajów roślin, dotyczące występowania tych związków, ich chemizmu, metod identyfikacji i analizy jakościowej i ilościowej oraz aktywności farmakologicznej.

Część teoretyczna jest napisana logicznie, z dużą znajomością przedmiotu, o czym świadczy dobry dobór cytowanych pozycji literatury. Cytowana literatura to głównie najnowsze pozycje obcojęzyczne, prawidłowo wyselekcjonowane z natłoku dostępnej informacji. Ta umiejętność selekcji i doboru pozycji najbardziej istotnych świadczy o dobrym rozeznaniu Doktorantki w piśmiennictwie światowym i najnowszych osiągnięciach badań w zakresie jej zainteresowań. Jestem przekonany, że część dotycząca rodzaju *Impatiens* po dopracowaniu, uzupełnieniu i przetłumaczeniu na język angielski może być dobrym materiałem do publikacji np. w *Phytochemistry Reviews* jako praca przeglądowa. Drobne potknięcia językowe jakie zdarzają się w tekście, wynikają z przeoczenia w trakcie

przygotowywania tak obszernej dysertacji i nie mają wpływu na merytoryczną stronę opracowania. Dlatego też nie podnoszę ich w niniejszej recenzji.

Część teoretyczną pracy poprzedza krótkie sformułowanie celu badań, w którym założono analizę fitochemiczną gatunku i izolację wybranych metabolitów z grupy saponozydów, galaktoglicerolipidów i flawonoidów oraz przebadanie aktywności biologicznej wyizolowanych związków i ekstraktów.

Duża objętościowo bo zawartą na 79 stronach jest część eksperymentalna. Opisano w niej wszystkie procedury analityczne, izolacyjne, badania aktywności biologicznej i aparaturę badawczą użytą w badaniach. Zawiera ona również wyniki badań. Ta część jest moim zdaniem niepotrzebnie przeładowana, gdyż większość to są procedury standardowe, stosowane w większości tego typu badań. Większość z nich to wręcz klasyczne metody. Należało zatem podać skrótowo opis i odnieść go do cytowanej literatury. Niemniej śledząc tok postępowania należy z uznaniem podkreślić, że doktorantka opanowała wiele technik fitochemicznych i prawidłowo się nimi posługuje. Wyodrębnianie pojedynczych związków z bogatej matrycy jaką jest ekstrakt roślinny to bardzo długi i żmudny proces. Jeśli zakończy się sukcesem tak jak w przypadku Doktorantki należy to przyjąć z dużym uznaniem. Pod tym względem wysoko oceniam jej umiejętności fitochemiczne.

Odnosząc się krytycznie do tego rozdziału chciałbym zwrócić uwagę na kilka zagadnień. Po pierwsze, nie jest dla mnie całkowicie jasne, czy i dlaczego badając poszczególne grupy metabolitów wtórnych tj. saponozydy, galaktoglicerolipidy i flawonoidy skupiono się na wybranych tylko związkach. Czy wyodrębnione i zidentyfikowane związki są jedynymi w swoich grupach? Co z pozostałymi jeśli są? Z chromatogramu przedstawionego na rycinie 16 wynika, że związków we frakcji R3 (flawonoidy) jest dużo więcej niż wybrany przez Doktorantkę IPF-1. Podobnie wygląda chromatogram frakcji R4, gdzie prążków saponinowych może być więcej niż IPS-1 i IPS-2. Osobiście jestem zwolennikiem kompleksowych prac dogłębnie analizujących każdą grupę.

Po drugie, analiza porównawcza TLC czy HPLC może być nie do końca prawdziwa. Dużo związków ma podobne R_f lub R_t , barwę lub widmo absorpcyjne, więc stwierdzenie tylko na podstawie rozdziału TLC czy HPLC identyczności związków nie jest do końca pewne. Mając do dyspozycji chromatograf cieczowy z detektorem masowym, dużo pewniej byłoby zastosować tę właśnie metodę, bo poza czasami retencji daje ona widma masowe i ich fragmentację, a to znacząco podnosi pewność identyfikacji.

Po trzecie, zastosowanie ekstrakcji ciecz-ciecz, szczególnie w przypadku saponozydów może prowadzić do zagubienia niektórych bardziej polarnych związków, które nie przechodzą do

butanolu. Na chromatogramie TLC (rycina 19) ekstraktu metanolowego (R2) na dole widać szereg ciemnych (saponinowych?) prążków. Czy sprawdzano czy są to cukrowce, czy może polarne saponozydy? Brak hemolizy nie oznacza, że związki nie należą do grupy saponin. Bardziej miarodajne byłoby użycie ekstrakcji do fazy stałej (SPE).

Dużego nakładu pracy wymagały testy aktywności biologicznej ekstraktów i wyodrębnionych związków. Przebadano aktywność przeciwzapalną, cytotoksyczność, hamowanie hialuronidazy, aktywność przeciwuleniającą (DPPH i FRAP) oraz przeciwdrobnoustrojową.

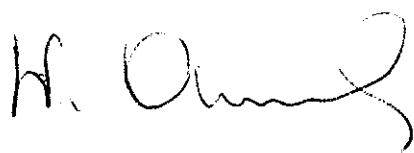
Po części doświadczałnej Doktorantka dokonała analizy uzyskanych wyników i omówienia ich na tle dostępnej literatury w 28 stronicowym paragrafie pt. „Dyskusja wyników”. Jest to bardzo ładnie i przejrzysto napisany rozdział, świadczący o dobrym rozumieniu przez Doktorantkę wartości uzyskanych wyników. Ta część jest dobrze osadzona w danych literaturowych. Wykazała ona, że różne części rośliny *I. parviflora* zawierają różne metabolity wtórne oraz potwierdziła obecność niektórych z nich opisanych w literaturze. Korzystając z analizy TLC i HPLC wykazała po raz pierwszy występowanie w badanym gatunku szeregu znanych związków takich jak: β -amyryna, skopoletyna, umbeliferon, β -sitosterol, izokwercytryna, hiperozyd kemferolu i luteoliny, kwas chlorogenowy, kwas izochlorogenowy i galusowy oraz pochodne diacylogliceroli. Wyodrębniony związek flawonoidowy okazał się być glukozydem kemferolu, znanym z wielu źródeł roślinnych. Metodami spektralnymi Doktorantka potwierdziła również po raz pierwszy występowanie w niecierpku drobnokwiatowym znanych z innych źródeł roślinnych dwóch galaktoglicerolipidów. Metodami spektralnymi ustaliła strukturę dwóch saponozydów, co stanowi najcenniejszą część ocenianej pracy. Obydwa związki należą do grupy monodesmozydów i są glikozydowymi pochodnymi kameliageniny A. Związki te różnią się od siebie tym, że jeden jest 16 α -acetylo pochodną drugiego z nich.

W wyniku przeprowadzonych licznych testów aktywności biologicznej *in vitro* Doktorantka uzyskała kilka ciekawych wyników. Nie stwierdziła aktywności przeciwbakteryjnej i fungistatycznej dla żadnego testowanego preparatu, jak również dla wyizolowanych związków. Aktywność przeciwutleniającą wykazywał jedynie ekstrakt alkoholowy z liści niecierpka i była ona skorelowana z ogólną zawartością polifenoli. Ekstrakt alkoholowy ze świeżych liści niecierpka wykazywał również dość wysoką aktywność w stosunku do ludzkich komórek linii czerniaka A375, ale wykonane badania nie pozwalają określić ani mechanizmu tego działania, ani substancji odpowiedzialnej za ten efekt, gdyż jedna z wyodrębnionych saponin wykazywała umiarkowaną aktywność w tym

względzie. Niemniej z uwagi na wagę problemu wydaje się, że obecne wyniki sugerują konieczność dalszych badań w tym kierunku. Ekstrakt ze świeżych liści wykazywał również aktywność przeciwzapalną i hamowanie hialuronidazy i wydaje się, że związkami odpowiedzialnymi za te efekty były galaktolipidy i glukozyd kemferolu zidentyfikowane w ocenianej pracy.

Podsumowując stwierdzam, że wyniki uzyskane przez Doktorantkę w ocenianej dysertacji stanowią cenny naukowo materiał badawczy, a postawione w celu pracy założenia zostały w pełni zrealizowane. Chciałbym wyraźnie podkreślić, że jest to materiał bardzo bogaty i wielowątkowy, o cennych dla nauki wnioskach. Przedstawione uwagi krytyczne, jakie zawarłem w ocenie mają oczywiście charakter dyskusyjny i marginalny, i w niczym nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny przedstawionej do recenzji pracy. Uważam, że zawiera ona wiele bardzo interesujących wątków (o niektórych nie wspomniałem w ocenie), a zastosowane techniki badawcze, ich ogromna różnorodność, dobra znajomość literatury, umiejętność klarownego przedstawienia wyników, świadczą o dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy naukowej. Przedstawiona do oceny praca odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim. W związku z powyższym stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Grabowskiej do publicznej obrony swojej pracy.

Puławy 4.06. 2016 r.



Prof. dr hab. Wiesław Oleszek
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
Państwowy Instytut Badawczy
W Puławach