



UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Farmakognozji

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 Pani **mgr Magdalena Walasek**

pt. „**Opracowanie warunków rozdzielania głównych ciał czynnych z wybranych gatunków roślin z rodziny Apiaceae i Labiatae oraz badania nad ich aktywnością biologiczną**”

Rozprawa została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. n. farm. Krystyny Skalickiej-Woźniak, w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

Poszukiwania nowych źródeł związków o właściwościach leczniczych oraz metod ich pozyskiwania pozostają wciąż głównym celem farmakognostów. Wśród substancji roślinnych o udokumentowanym działaniu leczniczym obok alkaloidów wymienia się chinony m.in. pochodne antracenu, fenylopropanoidy jak lignany i kumaryny czy terpenoidy, w tym składniki olejku eterycznego, posiadające wiele obiecujących aktywności. W ostatnich latach ujawniono zdolności kumaryn do hamowania enzymów ośrodkowego układu nerwowego, szczególnie acetylocholinoesterazy (AChE), butyrylocholinoesterazy (BChE) oraz tyrozynazy. Esterazy cholinowe uczestniczą w hydrolizie neuroprzekaźnika acetylocholinę, są także zaangażowane w tworzenie kompleksów z β -amyloidem i białkiem tau, przyczyniając się do powstawania patologicznych płytek starczych. Następstwem nasilonej aktywności tych enzymów są zaburzenia funkcjonowania układu nerwowego objawiające się niewłaściwym przekaźnictwem neuronalnym oraz uszkodzeniem komórek nerwowych. W efekcie dochodzi do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, w tym najczęstszej postaci otępienia choroby Alzheimera. W stanie fizjologicznym aktywność butyrylocholinoesterazy jest niewielka, jednak w miarę rozwoju choroby, gdy neurony cholinergiczne obumierają, enzym ten staje się bardziej aktywny a jego zahamowanie pozwala efektywniej

zwiększyć poziom acetylocholíny. Obecnie postępowanie lecznicze w chorobie Alzheimera obejmuje zmniejszanie objawów chorobowych, poprzez normalizację neurotransmisji w układzie cholinergicznym mózgu, co prowadzi do poprawy funkcji poznawczych oraz behawioralnych. Z hipotetycznie możliwych metod zwiększania przekaźnictwa cholinergicznego jedynie inhibitorom cholinoesteraz udowodniono skuteczność przy względnie niewielkich działaniach ubocznych.

W przypadku zwiększonej aktywności tyrozynazy dochodzi natomiast do wzmożonej syntezy dopaminy i nasilenia aktywności układu nerwowego. Zaburzenia związane z nadaktywnością tego enzymu przyczyniają się do powstania choroby Parkinsona.

Ze względu na zmiany, jakie następują w OUN w przypadku nadmiernej aktywności powyższych enzymów bardzo ważne jest poszukiwanie odpowiednich inhibitorów. Jedną z grup związków hamujących ich aktywność są właśnie kumaryny często identyfikowane w gatunkach z rodziny selerowatych. Zdolność hamowania acetylocholinoesterazy wśród kumaryn wykazują m.in. suberozyna, suberenol, pochodne psoralenu jak bergapten i ksantotoksyna oraz pimpinelina i izopimpinelina. Przykładowo, furanokumaryny otrzymane z części naziemnych *Heracleum platytaenium* Boiss. (Apiaceae) hamują aktywność cholinoesteraz na poziomie 38-78%.

Ocena merytoryczna pracy

Zasadniczym celem recenzowanej rozprawy doktorskiej było opracowanie metod pozyskiwania głównych substancji aktywnych z surowców roślinnych z rodziny Apiaceae takich jak marchwica pospolita - *Mutellina purpurea* (Poir.) Reduron, Charpin & Pimenov; barszcz Mantegazziego - *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier; arcydzięgiel litwor - *Angelica officinalis* L. oraz olejków eterycznych z *H. mantegazzianum* i tymianku pospolitego - *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae = Labiatae). Otrzymane wyciągi, frakcje i składniki indywidualne poddane były następnie badaniom biologicznym *in vitro*.

Cel pracy doktorantka zrealizowała poprzez systematyczne wykonanie prawidłowo dobranych i zaplanowanych badań szczegółowych, tj.:

- wstępną analizę jakościową i ilościową związków kumarynowych oraz składników olejków eterycznych z zastosowaniem metod chromatograficznych (LC-DAD, GC-MS, biblioteki widm NIST 2011 oraz MassFinder 2);
- optymalizację metod ekstrakcji kumaryn z różnych części *M. purpurea* z zastosowaniem ekstrakcji wspomagananej ultradźwiękami (UAE) oraz przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika (ASE);

- separację związków kumarynowych, terpenoidów oraz estrów alifatycznych z badanych przetworów roślinnych z wykorzystaniem techniki chromatografii przeciwprądowej (CCC), poprzedzone doбором odpowiedniego układu dwufazowego;
- identyfikacja związków wyizolowanych oraz szerszego składu badanych ekstraktów i olejków eterycznych z zastosowaniem technik spektrometrycznych i łączonych: 1D-, 2D-NMR, LC-ESI-qTOF-MS, GC-MS;
- badania biologiczne wyciągów, olejków eterycznych, indywidualnych związków oraz ich mieszanin, ze szczególnym uwzględnieniem aktywności przeciwdrobnoustrojowej, antyoksydacyjnej oraz zdolności hamowania enzymów istotnych w procesach neurodegeneracyjnych, tj. acetylocholinoesterazy, butyrylocholinoesterazy i tyrozynazy.

Pani mgr Magdalena Walasek do badań własnych wybrała gatunki szeroko rozpowszechnione we florze polskiej jak marchwica pospolita i arcydzięgiel litwor, ale także barszcz Mantegazziego gatunek inwazyjny charakteryzujący się właściwościami fototoksycznymi czy tymianek pospolity uprawiany do zastosowań farmaceutycznych i spożywczych. Gatunki te znane są z zawartości kumaryn i/lub olejku eterycznego, którym przypisywany jest znaczny potencjał leczniczy.

Recenzowana monografia posiada układ typowy dla prac fitochemicznych o charakterze eksperymentalnym. Tekst obejmuje 198 stron i składa się z X. części – wstęp, część teoretyczna, cel pracy, część doświadczalna, dyskusja, podsumowanie i wyniki, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz tabel i rycin oraz piśmiennictwo. W **części teoretycznej** obejmującej 8 podrozdziałów (39 stron) Autorka przedstawiła systematykę badanych gatunków, ich charakterystykę botaniczną i obszary występowania oraz dotychczasowy stan badań odnośnie składu chemicznego, właściwości i zastosowań w lecznictwie. Dalsze rozdziały poświęciła opisowi budowy, klasyfikacji i właściwości farmakologicznych kumaryn i olejków eterycznych. Istotnym elementem tej części rozprawy jest podrozdział 1.8, w którym omówiła na podstawie aktualnego piśmiennictwa naukowe nowszą technikę separacji badanych grup związków naturalnych a mianowicie wysokosprawną chromatografię przeciwprądową - HPCCC.

Podsumowując, część teoretyczna stanowi bardzo dobrą podstawę do przedstawionych badań, choć Doktorantka nie uniknęła pewnych błędów dotyczących układu proponowanych rozdziałów oraz ich tytułów. Część teoretyczna zawiera 1 rozdział „Kumaryny” obejmujący 8 podrozdziałów, które tematycznie nie zawsze można powiązać z wiodącym tytułem, m.in. 1.5.1. „*Thymus vulgaris* L.” czy 1.7. „Olejki eteryczne” lub są powtórzeniem jak 1.6 „Kumaryny”. W podrozdziale 1.3 „Budowa morfologiczna i anatomiczna” Autorka zamieściła opis morfologiczny

badanych gatunków oraz ich naturalnych siedlisk i zakresów występowania, zabrakło natomiast charakterystyki anatomicznej, której można było się spodziewać z odnośnego tytułu.

W **części doświadczalnej** obejmującej 8 rozdziałów (80 stron), mgr Magdalena Walasek przedstawiła ze szczegółami zastosowane metody badawcze i materiały wykorzystane w analizie chromatograficznej, testach antyoksydacyjnych i doświadczeniach biologicznych *in vitro*. Zgodnie z opisem aktywność przeciwdrobnoustrojową otrzymanych wyciągów, frakcji i wydzielonych indywidualnych kumaryn wobec kilkunastu szczepów tlenowych i względnie beztlenowych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz grzybów drożdżopodobnych z kolekcji ATCC (*American Type Culture Collection*) badała we współpracy z Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej UM w Lublinie, natomiast olejku eterycznego z owoców barszczu Mantegazziego, jego frakcji i wydzielonych składników na Wydziale Rolnictwa Uniwersytetu w Aleksandrii (Egipt). Tam też oceniła właściwości przeciwutleniające testem DPPH i w układzie β -karoten/kwas linolowy (wg procedury Elansary i Mahmouda, 2015). Potencjał hamowania cholinoesteraz (AChE i BChE) i tyrozyminy przez substancje otrzymane z marchwicy pospolitej analizowała we współpracy z Katedrą Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Gazi (Ankara, Turcja).

Badania własne Doktorantka zaplanowała dobrze i systematycznie zrealizowała, a uzyskane wyniki z poszczególnych etapów obszernie omówiła w kontekście aktualnego piśmiennictwa z dziedziny. Rozdziały poświęcony omówieniu wyników, dyskusji i podsumowanie (16 punktów) obejmują kolejne 33 strony. Piśmiennictwo – w układzie alfabetycznym, dobrała i cytowała prawidłowo. Z ostatniej dekady cytowanych jest 116 publikacji, głównie anglojęzycznych, m.in. z Listy Filadelfijskiej. Ich wykorzystanie w pracy, w kolejnych rozdziałach a w szczególności w dyskusji, świadczy o umiejętności korzystania z zasobów piśmiennictwa naukowego oraz o dobrym tematycznym rozeznaniu.

Zwieńczeniem przeprowadzonej badań własnych było zgodnie z założeniami opracowanie 5 optymalnych metod HPLC służących wydajnej izolacji składników aktywnych przetworów z owoców *M. purpurea*, *H. mantegazzianum* i *A. officinalis* oraz ziela *T. vulgaris*. Struktury wydzielonych związków kumarynowych i składników olejkowych mgr Magdalena Walasek określiła na podstawie analizy widm UV, MS, ^1H - i ^{13}C -NMR oraz korelacyjnych COSY, NOESY, HMQC, HMBC. Pełny skład chemiczny poddanych badaniom wyciągów i olejków eterycznych ustaliła z zastosowaniem dziś już powszechnie stosowanych metod łączonych (LC-ESI-qTOF-MS i GC-MS).

W wyniku przeprowadzonych prac z owoców *M. purpurea* wydzieliła i zidentyfikowała ostol oraz 3 dihydropiranokumaryny o rzadko spotykanej strukturze - **pteryksynę, hyuganinę C**

i **hyuganinę A**. Dodatkowo, dzięki zastosowaniu LC-ESI-qTOF-MS, na podstawie analizy fragmentacji cząsteczek po raz pierwszy zidentyfikowała w tym gatunku kolejne 2 składniki - **auraptenol** i **hyuganinę D**. Z owoców *H. mantegazzianum* wyizolowała dalsze 3 związki kumarynowe - **pimpinelinę**, **imperatorynę** i **feloptyerynę**, natomiast z *A. officinalis* 4 główne składniki - **ksantotoksynę**, **bergapten**, **imperatorynę** i **izoimperatorynę**. Oznaczyła również zawartości poszczególnych kumaryn w wyciągach przygotowanych z owoców, kwiatów i ziela marchwicy pospolitej w różnych warunkach procesu ekstrakcji.

W olejku eterycznym otrzymanym z owoców *H. mantegazzianum* Doktorantka przy zastosowaniu GC-MS potwierdziła obecność 35 składników, przeważnie estrów alifatycznych. Następnie odpowiednio dobraną metodą HPLC otrzymała 5 głównych związków: ***n*-oktanol**, **octan *n*-oktylu**, **maślan heksylo-2-metylu**, **izomaślan *n*-oktylu** oraz **maślan oktylo-2-metylu** (o wysokiej czystości przekraczającej 98%). Z olejku tymiankowego analogiczną techniką wydzieliła 11 indywidualnych składników: **eugenol**, **1-okten-3-ol**, **borneol**, **tymol**, **terpinen-4-ol**, **kamforę**, **karwakrol**, **octan linalylu**, **tlenek kariofilenu**, ***p*-cymen** i **eukaliptol** (czystość powyżej 97%). Należy odnotować, że dotychczas nie zaproponowano metod HPLC do sprawnej izolacji składników czynnych z olejków eterycznych barszczu Mantegazziego i olejku tymiankowego.

W podsumowaniu tej części, stwierdzam duży potencjał aplikacyjny opracowanych procedur. Charakteryzują się one wysoką selektywnością oraz krótkim czasem separacji. Dla uzyskanych przetworów Autorka przeprowadziła optymalizację warunków w skali analitycznej, które następnie przeniosła do skali półpreparatywnej. Łącznie w toku prac fitochemicznych wydzieliła **25 związków** o zróżnicowanej budowie.

W dalszych etapach badań własnych otrzymane wyciągi, olejki eteryczne, indywidualne składniki i frakcje mgr Magdalena Walasek poddała testom na aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec chorobotwórczych bakterii i grzybów. Największą aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich wykazała dla ostolu (MIC=0,03 mg/ml) oraz hyuganina C (MIC=0,06 mg/ml). Wyciągi dichlorometanowe otrzymane z owoców *H. mantegazzianum* i *A. officinalis* hamowały natomiast rozwój grzybów drożdżopodobnych, zwłaszcza *Candida parapsilosis* (MIC=0,06 mg/ml). Autorka po raz pierwszy wykazała aktywność przeciwdrobnoustrojową pimpinelininy i felopteryny, izolowanych z owoców barszczu kaukaskiego. Felopteryna najsilniej hamowała wzrost *S. aureus* (MIC=0,03 mg/ml). Przeprowadzone badania ujawniły ponadto, iż mieszaniny związków kumarynowych otrzymanych z *H. mantegazzianum* i *A. officinalis* wykazują synergizm działania przeciwdrobnoustrojowego. Zaobserwowała m.in. wysoką skuteczność mieszaniny bergaptenu i angelicyny wobec *B. cereus* oraz drożdży (MIC=0,06 mg/ml). Ciekawe rezultaty uzyskała także dla

olejku eterycznego z barszczu Mantegazziego i *n*-oktanolu, który hamował wzrost *E. coli* na poziomie wyższym niż ampicylina i streptomycyna.

Niezmiernie obiecujące właściwości odnotowała w badaniach owoców *M. purpurea* oraz ich głównego składnika hyuganiny C w kierunku hamowania aktywności cholinoesteraz i tyrozynazy. Wykazała, że ekstrakt eteru naftowego i hyuganina C posiadają zdolność wybiórczego hamowania butyrylocholinoesterazy (w ok. 88%) - wobec acetylocholinoesterazy pozostały nieaktywne. Siła obserwowanego działania hyuganiny C w tym zakresie była nawet wyższa od referencyjnej galantaminy (ok. 80%). Zahamowanie tyrozynazy przebiegało na poziomie znacznie niższym (6-13,5% zależnie od stężenia) i wyłącznie dla hyuganiny C.

W tym miejscu pragnę podkreślić, że wyniki uzyskane dla *M. purpurea* zarówno w zakresie badań fitochemicznych jak i właściwości biologicznych mają charakter nowości naukowej.

Recenzowana monografia mgr Magdaleny Walasek została opracowana zgodnie z zasadami przyjętymi dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk farmaceutycznych. Napisana jest poprawną polszczyzną. Oceniając stronę graficzną pracy można dostrzec szczegółowe udokumentowanie prowadzonych doświadczeń w postaci zamieszczonych: 23 tabel i 40 rycin (w tym przedstawiające chromatogramy, szlaki fragmentacji i struktury związków wydzielonych i/lub zidentyfikowanych).

Niestety, przy redagowaniu pracy Autorka popełniła kilka błędów, które przytaczam poniżej:

- niektóre gatunki wymieniane w części teoretycznej nie posiadają cytatu – nazwiska autora, wymaganego zgodnie z zasadami Międzynarodowego Kodeksu Nomenklatury Botanicznej (ICBN), ponadto w podrozdziale 1.2.1. „Systematyka” nazwy polskie (zwyczajowe) taksonów roślin niepotrzebnie zostały zapisane z dużej litery;
- opis jonów pseudomolekularnych i fragmentacyjnych otrzymanych w analizie LC-ESI-qTOF-MS wyciągu z owoców *H. mantegazzianum*, charakteryzujących struktury kumaryn w trybie jonów dodatnich, wymaga weryfikacji;
- w tabeli 9, przedstawiającej dane odnośnie ilości poszczególnych kumaryn w wyciągach *M. purpurea* należało wyrazić ich zawartości w przeliczeniu na 1g przetworu lub w % (*m/m*);
- odnotowałam ponadto drobny błąd w nazwach esteraz cholinowych, prawidłowe terminy to acetylocholinoesteraza (AChE) - hydrolaza acetylocholiny (E.C.3.1.1.7) oraz butyrylocholinoesteraza (BChE) – pseudochoolinoesteraza, acylohydrolaza acylocholiny (E.C.3.1.1.8);

- punkt 16, kończący podsumowanie „Z uwagi na to, iż przedmiotem badań były gatunki powszechnie występujące, często traktowane jako chwasty, ważne było opracowanie metod ich utylizacji oraz wykorzystania w celach przemysłowych” niestety nie znajduje poparcia w prezentowanych wynikach i jest prawdopodobnie przejawem nadmiernego entuzjazmu.

Pragnę jednak podkreślić, iż wartość merytoryczna niniejszej rozprawy doktorskiej jest wysoka i świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu jej Autorki do dalszej pracy naukowej. Pani mgr Magdalena Walasek skutecznie opanowała trudną umiejętność planowania, a następnie sukcesywnej realizacji badań naukowych. Wykazuje przy tym dobre zrozumienie zagadnień teoretycznych z zakresu tematu, znajomość warsztatu badań fitochemicznych i zastosowanych metod biologicznych oraz potrafi podsumować i krytycznie omówić wyniki własne w odniesieniu do publikacji innych autorów. Gruntowne przygotowanie znalazło swój wyraz w przeprowadzonej dyskusji, a także w opublikowanych pracach naukowych z jej udziałem.

Dotychczasowy dorobek naukowy Doktorantki obejmuje 4 publikacji, o łącznym współczynniku wpływu **IF = 9,42** oraz punktacji ministerialnej 115. Pani magister jest pierwszym autorem jednej publikacji naukowej o charakterze doświadczalnym oraz drugim autorem kolejnych dwóch artykułów. Tematyka 2 prac związana jest z recenzowaną rozprawą doktorską:

1. Krystyna Skalicka-Woźniak, Tomasz Mroczek, **Magdalena Walasek**, Kazimierz Głowniak: Efficient isolation of dihydropyranocoumarins and simple coumarins from *Mutellina purpurea* fruits. *Planta Med.* 2016, 82, 11/12, 1105-1109 (IF=1,990; MNiSW=25)

2. **Magdalena Walasek**, Agnieszka Grzegorzczuk, Anna Malm, Krystyna SkalickaWoźniak, Bioactivity-guided isolation of antimicrobial coumarins from *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier (Apiaceae) fruits by high-performance countercurrent chromatography: *Food Chem.*, 2015, 186, 133-138 (IF=3,391; MNiSW=40)

Ponadto wygłosiła 3 prezentacje ustne i była współautorem 11 doniesień zjazdowych w formie plakatów prezentowanych na konferencjach międzynarodowych i krajowych.

Wnioski końcowe

W świetle powyższej, pozytywnej oceny stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z dn. 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami).

Na tej podstawie **wniosuję do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie mgr Magdaleny Walasek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Zaangażowanie w pracę badawczą Doktorantki oraz opracowanie oryginalnych metod pozyskiwania substancji aktywnych o potencjale leczniczym z wybranych przetworów roślinnych przy zastosowaniu nowoczesnych narzędzi badawczych **zasługuje w moim przekonaniu na wyróżnienie.**

dr hab. n. farm. Izabela Fecka

