



Gdański Uniwersytet Medyczny  
Wydział Farmaceutyczny  
Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL

Gdańsk, 30.09.2022 r.

## **OCENA**

**pracy doktorskiej mgr Agnieszki Bodalskiej**

**pt: „Ocena zawartości i stabilności związków polifenolowych w produktach leczniczych zawierających przetwory z wybranych substancji roślinnych z rodziny Lamiaceae”**

**przedstawiona Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne  
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu**

Pragnę podziękować Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu za powierzenie mi zaszczytu recenzowania rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Bodalskiej zatytułowanej „Ocena zawartości i stabilności związków polifenolowych w produktach leczniczych zawierających przetwory z wybranych substancji roślinnych z rodziny Lamiaceae” przygotowanej w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji i Leku Roślinnego, Wydziału Farmaceutycznego pod kierunkiem prof. dr hab. n. farm. Izabeli Feckiej i dr n. farm. Adama Kowalczyka jako promotora pomocniczego.

Inspiracją dla podjętej przez Doktorantkę tematyki badawczej, w przedstawionej Wysokiej Radzie rozprawie, są zainteresowania naukowe i dorobek Promotora Pani prof. dr hab. n. farm. Izabeli Feckiej, która należy do grona wybitnych polskich farmakognostów młodszej generacji i specjalistów w obszarze produktu ziołowego – jego jakości i skuteczności oraz bezpieczeństwa stosowania.

Nowoczesny lek pochodzenia roślinnego, charakteryzuje się powtarzalnym efektem terapeutycznym jako konsekwencją przeprowadzanego procesu standaryzacji monoekstraktów roślinnych będących materiałami wyjściowymi do wytwarzania produktów leczniczych roślinnych. Skuteczność terapeutyczna leków roślinnych wynika nie tylko z określenia zawartości związków czynnych determinujących ich podstawowe działanie lecznicze ale jest również związana ze zjawiskiem synergizmu i poliwalencji charakterystycznych dla tej kategorii produktów leczniczych. Z tego punktu widzenia mają zasadnicze znaczenie badania szerokiego spektrum związków obecnych w surowcach roślinnych, dla których wykrywane są nowe, interesujące zakresy aktywności biologicznych, poprzez które włączają się one w finalny efekt terapeutyczny surowca/produktu roślinnego. Nauka dostarcza systematycznie nowych danych i muszą być one uwzględniane w ocenie jakości i efektywności leczniczej produktów ziołowych, obecnych na rynku farmaceutycznym, szczególnie tych o statusie produktu leczniczego roślinnego. W obszar tych badań włącza się przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Agnieszki Bodalskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi cykl 3 prac eksperymentalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach o łącznej wartości współczynnika wpływu IF – 10,604, mianowicie

1. Bodalska A., Kowalczyk A., Włodarczyk M., Fecka I. Analysis of polyphenolic composition of a herbal medicinal product – peppermint tincture. *Molecules* 2020, 25 (1), 69, <https://doi.org/10.3390/molecules25010069>; IF- 4,411
2. Bodalska A., Kowalczyk A., Fecka I. Quality of herbal medicinal products based on sage and thyme preparations. *Acta Pol. Pharm. - Drug Research* 2021, 78 (4), 539-561. <https://doi.org/10.32383/appdr/142055>; IF- 0,330
3. Bodalska A., Kowalczyk A., Fecka I. Stability of rosmarinic acid AND flavonoid glycosides in liquid forms of herbal medicinal products – a preliminary study. *Pharmaceuticals* 2021, 14 (11), 1139 <https://doi.org/10.3390/ph14111139>; IF- 5,863.

spośród których, 2. zostały opublikowane w czasopismach należących do I kwartyła w dziedzinie nauk farmaceutycznych (publikacja 1 -*Molecules* i publikacja 3 - *Pharmaceuticals*). Jest to potwierdzeniem wysokiej wartości naukowej prac objętych cyklem. Wymienione prace, stanowią tematycznie spójny zbiór artykułów, w których pierwszym autorem jest Doktorantka, a udziały określające indywidualny wkład poszczególnych współautorów w powstanie prac zostały przedstawione w załączonych w rozprawie doktorskiej oświadczeniach.

W publikacji 1. jest to wykonanie badań przez Doktorantkę, opracowanie otrzymanych danych eksperymentalnych oraz przygotowanie oryginalnego tekstu pracy (udział 30%), w publikacji 2. przygotowanie projektu badań, walidacja metod, analiza formalna, wykonanie badań, przygotowanie oryginalnego tekstu pracy (udział 35%), w publikacji 3. przygotowanie projektu badań, walidacja metod, analiza formalna, wykonanie badań, opracowanie otrzymanych danych eksperymentalnych, przygotowanie oryginalnego tekstu pracy (udział 40%).

Doktorantka badaniami, przede wszystkim o charakterze fitochemicznym, włączającym analizę jakościową i ilościową związków chemicznych o aktywności biologicznej, objęła przetwory z trzech surowców z rodziny Lamiaceae, mianowicie liścia mięty pieprzowej, ziela tymianku oraz liścia szafalii jako pojedynczych substancji czynnych roślinnych oraz jako składników produktów o złożonym składzie – będących mieszaninami przetworów otrzymywanych również z innych surowców roślinnych, obok tych badanych przez Doktorantkę szczegółowo. Do badań użyła powszechnie stosowanych narzędzi w analizie fitochemicznej, mianowicie technik chromatograficznych, głównie wykorzystwała systemy sprzężenia wysokosprawnej chromatografii cieczowej z selektywnymi detektorami, mianowicie: detektorem stanowiącym matrycę diodową, spektrometr mas z jonizacją ESI oraz tandemową spektrometrię mas MS/MS.

Zastosowanie chromatograficznych metod sprzężenia HPLC-DAD/ESI-MS oraz MS/MS umożliwiło rozpoznanie szeregu związków aktywnych biologicznie jako składników badanych matryc roślinnych w oparciu o porównanie parametrów chromatograficznych takich jak wartość  $t_R$ , wartości  $m/z$   $[M-H]^-$  jonów pseudomolekularnych, jonów fragmentacyjnych, ze związkami wzorcowymi, pochodzącymi ze źródeł komercyjnych jak i izolowanych przez Doktorantkę z innych surowców roślinnych. Ponadto poprzez analizę otrzymanych wartości parametrów chromatograficznych, wymienionych powyżej, z wykorzystaniem dostępnych danych literaturowych i porównanie ścieżek fragmentacyjnych, zidentyfikowała wstępnie również pozostałe liczne składniki fitochemiczne badanych matryc roślinnych oraz produktów roślinnych, i na tej podstawie niektóre związki chemiczne wykryła po raz pierwszy w badanych substancjach czynnych roślinnych, w tym zaproponowała również dla niektórych z nich ścieżki fragmentacyjne MS/MS np. dla tetrameru kwasu salwianolowego E. Przeprowadzenie badań chromatograficznych oraz interpretacja otrzymanych danych wymagała od Doktorantki pogłębionej wiedzy z zakresu spektroskopii UV i spektrometrii mas metabolitów wtórnych

należących do różnych klas naturalnych związków chemicznych - flawonoidów, kwasów fenolowych pochodnych kwasu kawowego, lignanów, fenylopropanoidów i innych. Z tego obszaru kieruję pytanie do Doktorantki, czy w oparciu o otrzymane widma UV związków flawonoidowych w systemach HPLC-UV (DAD) możemy rozróżnić pochodne apigeniny od luteoliny ?.

Do znaczących osiągnięć przeprowadzonych przez Doktorantkę, w toku realizacji pracy doktorskiej, analiz fitochemicznych z użyciem narzędzi chromatograficznych należy zaliczyć:

- rozpoznanie w nalewce miętowej 35. związków, wśród nich 12. kwasów fenolowych pochodnych kwasu kawowego należących do garbników typu Lamiaceae, 12. flawonów, 8. flawanonów, 2. pochodnych kwasu jasmonowego i 1. lignanu, w tym po raz pierwszy zidentyfikowanie w tym przetworze i surowcu stanowiącym liść mięty pieprzowej, 3. związków, mianowicie kwasu salwianolowego C, siarczanu kwasu tuberonowego i glukozydu kwasu tuberonowego
- w przetworach z liści szafwii 65. związków, w tym 7. pochodnych kwasu kawowego, 14. flawonoidów pochodnych luteoliny i apigeniny w formie glikozydów i glikozydoestrów, 13. związków z grupy terpenów i ich pochodnych oraz fenylopropanoidów, pochodnych kwasu 12-hydroksy-jasmonowego, pochodnych alkoholu benzylowego i glikozydu fenolowego szimobaszirazydu C
- w przetworach z ziela tymianku (*T.vulgatis*/*T. zygis*) 57. związków, mianowicie 10. estrów kwasu kawowego, jako grupy metabolitów dominującej, w tym rozpoznała po raz pierwszy w tych gatunkach przypuszczalnie kwas sagerynowy (lub jego izomer) oraz heksozyd ( $\alpha$ -hydroksyhydroferuloilokawoil)-kawoilowy, obok znanych: kwasu rozmarynowego, kwasów salwianolowych A, B, K, 12. flawonów, w tym dwóch nowych w badanych gatunkach, mianowicie 7-O-(apiozylo- acetylo)-glukozydu luteoliny, 3'-O-glukozydu 7-O-glukuronidu luteoliny i 6.flawanonów.

Ponadto Doktorantka oceniła metodą HPLC-DAD profil ilościowy składników fitochemicznych badanych przetworów (przebadła około 60 komercyjnych produktów), wskazując na znaczące rozbieżności w poziomach ich zawartości w różnych seriach danego produktu oraz w produktach pochodzących od różnych producentów. W przetworach z liścia mięty pieprzowej oznaczyła zawartość 10. dominujących związków z grupy flawonoidów i kwasów fenolowych, natomiast w przetworach z ziela tymianku i liścia szafwii - 8. związków.

Sformułowany przez Doktorantkę wniosek, że odnotowane różnice będą miały wpływ na siłę efektu terapeutycznego badanych produktów uważam za słuszny, w kontekście wykazywanych przez nie rodzajów aktywności biologicznej, jakkolwiek w mojej opinii, mógł on zostać wstępnie zweryfikowany chociażby poprzez wybiórcze oznaczenie aktywności biologicznej, np. w testach aktywności antyoksydacyjnej. Wyniki analiz ilościowych uważam za bardzo wartościowe, ponieważ różnicują one badane substancje czynne roślinne w zakresie profili metabolicznych, mianowicie klasyfikują przetwory z liścia szafwii i ziela tymianku jako bogatsze w kwasy fenolowe, głównie kwas rozmarynowy, i uboższe we flawonoidy (wykazane niższe stężenia związków flawonoidowych), natomiast przetwory z liścia mięty pieprzowej jako bogatsze we flawonoidy z niższą zawartością kwasów fenolowych, z dominującym kwasem rozmarynowym. Rozpatrując proporcje stężeń kwasy fenolowe/flawonoidy w kontekście ich właściwości farmakologicznych i biologicznych, znajdujemy wyjaśnienie silniejszej aktywności spazmolitycznej liścia mięty pieprzowej (dominują flawonoidy) i silniejszej aktywności przeciwzapalnej, przeciwdrobnoustrojowej dla ziela tymianku/liścia szafwii. W kontekście analiz ilościowych, przeprowadzonych przez Doktorantkę, nasuwa się pytanie dlaczego do analiz ilościowych wybrała system HPLC-DAD a nie system HPLC-MS, którym dysponowała i który umożliwia oznaczenie słabo rozdzielających się z użyciem detektora UV związków ?.

Wartościowym wątkiem podjętym przez Doktorantkę są badania stabilności nielotnych składników ocenianych przetworów, po raz pierwszy przeprowadzone dla krajowych produktów ziołowych z użyciem 3 testów stabilności (długoterminowym, pośrednim i krótkoterminowym), ujawniające krótsze okresy stabilności wyznaczone na podstawie badań indywidualnych polifenoli: kwasu rozmarynowego i eriocytryny w większości badanych przetworów i produktów, z wyjątkiem 7- O-glukuronidu luteoliny w produkcie stanowiącym wyciąg płynny z szafwii i tymianku do stosowania zewnętrznego.

Opublikowane w formie oryginalnych artykułów naukowych wyniki właściwie zaplanowanych eksperymentów, z prawidłową ich oceną statystyczną (warto podkreślić, że Doktorantka ukończyła w 5-dniowy kurs z zakresu biostatystyki na Uniwersytecie Medycznym w Rotterdamie w roku 2020), poprzedzono w dysertacji streszczeniem w języku polskim i angielskim. We wprowadzeniu Doktorantka przedstawiła wymagania farmakopealne w zakresie oceny wartości leczniczej badanych substancji roślinnych, w tym również otrzymywanych z nich przetworów, na tle krótkiej charakterystyki ich składu chemicznego oraz omówienia znaczenia związków polifenolowych dla wywieranych przez nie efektów

biologicznych (antyoksydacja) i leczniczych. Obejmujące około 3 stron wprowadzenie jest sprawnym, opartym na naukowych odniesieniach przedstawieniem problemów ze standaryzacją efektów terapeutycznych znanych i popularnych surowców roślinnych oraz zawierających, otrzymywane z nich przetwory, produktach leczniczych, stanowiąc jednocześnie merytoryczne odniesienie do sformułowanego celu pracy. Należy podkreślić, że osiągnięciem pracy jest nie tyle zakładana w celu pracy „weryfikacja profilu składników nietlonych i ocena zawartości głównych związków polifenolowych” ale przede wszystkim rozpoznanie po raz pierwszy w badanych przetworach szerokiego profilu związków czynnych z różnych grup metabolitów wtórnych.

Tekst rozprawy został przygotowany z bardzo dużą starannością i nie odnotowałam w nim znaczących błędów np. typograficznych, stylistycznych i innych. Doktorantka w sposób przejrzysty, scharakteryzowała w rozdziale Materiały i metody użyty materiał do badań (Tabela 1), opisała pochodzenie związków wzorcowych, scharakteryzowała warunki analiz HPLC-MS i HPLC-DAD oraz użyte testy stabilności a także zastosowane narzędzia analizy statystycznej, następnie omówiła na 3. stronach Najważniejsze wyniki, zawarte w publikacjach z cyklu stanowiącego rozprawę, oraz dokonała Podsumowania osiągniętych celów cząstkowych, na podstawie których sformułowała Wnioski końcowe.

W zakończeniu mojej recenzji stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Bodalskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wnosi znaczące elementy nowości do stanu wiedzy o kompozycji związków czynnych w substancjach czynnych roślinnych – liściu mięty pieprzowej, liściu szatwii i zielu tymianku, stanowiących składniki produktów leczniczych roślinnych, posiada również duże znaczenie praktyczne w kontekście kontroli jakości i skuteczności terapeutycznej produktów leczniczych roślinnych. Kandydatka wykazała się ogólną wiedzą teoretyczną oraz praktyczną w dyscyplinie nauki farmaceutycznej. Załączony w dysertacji wykaz publikacji (8. publikacji w czasopiśmie z IF, i 3. w czasopiśmie bez IF) i streszczeń zjazdowych (21) w których mgr Agnieszka Bodalska jest jednym ze współautorów, przygotowany przez Bibliotekę Główną Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, świadczy o jej dużej aktywności naukowej, wybiegającej poza wątki związane z realizacją tematu doktorskiego.

Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Bodalskiej spełnia wymagania dotyczące nadawania stopni wg. ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789). Na tej podstawie wnioskuję do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Agnieszki Bodalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę znaczącą wartość, zarówno naukową jak i praktyczną podjętego tematu, wkład w rozwój nauk o leku roślinnym, rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Bodalskiej wnoszę o jej wyróżnienie.

prof. dr hab. n. farm. Mirosława Krauze-Baranowska  
Katedra i Zakład Farmakognozji z ORL  
Gdański Uniwersytet Medyczny

Kierownik  
Katedra i Zakład Farmakognozji  
Z Ogrodem Roślin Leczniczych  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
  
prof. dr hab. n. farm. Mirosława Krauze-Baranowska