

Ocena

**Rozprawy doktorskiej mgr kosm. Beaty Kamińskiej pt. „Aktywność przeciwgrzybicza
wybranych związków i ekstraktów z niektórych gatunków rodzaju *Centaurea* L.”
wykonanej w Katedrze i Zakładzie Naturalnych Surowców Leczniczych i
Kosmetycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

Celem rozprawy doktorskiej podjętej przez mgr kosmetologii Beatę Kamińską była izolacja substancji chemicznych występujących w pozakrajowych gatunkach *Centaurea* i określenie ich działania na grzyby drożdżoidalne i dermatofity chorobotwórcze dla człowieka. Motywem tego przedsięwzięcia było zaproponowanie nowego preparatu przeciwgrzybiczego, ponieważ wzrost oporności tych drobnoustrojów na dotychczas stosowane antybiotyki i chemioterapeutyki oraz ich szkodliwe dla organizmu ludzkiego działania uboczne, skłaniają do poszukiwania środków pochodzenia naturalnego wolnych od tych niekorzystnych właściwości.

Badaniami objęto dwa gatunki roślin z rodzaju *Centaurea* L., a mianowicie *Centaurea bella* Trautv. rosnącego w Turcji i *Centaurea sibirica* L. pochodzącego z Kazachstanu. Materiałem do badań były liście wymienionych roślin, które wyhodowano z nasion w Ogrodzie Katedry i Zakładu, w którym wykonywana była praca doktorska. Z wysuszonych i rozdrobnionych surowców sporządzono ekstrakty metanolowe i octanowoetylowe. Posłużyły one do badań chromatograficznych, za pomocą których wyizolowano poszczególne związki biologicznie aktywne, a także do badań mikrobiologicznych, dzięki którym oceniono ich działanie przeciwgrzybicze.

Doktorantka rozdzielała uzyskane ekstrakty za pomocą chromatografii kolumnowej i identyfikowała je na drodze kochromatografii i metod spektralnych. Z liści *Centaurea bella* wyizolowała ona 5 pojedynczych laktonów seskwiterpenowych, a mianowicie: cebellinę A, cebellinę B, cebellinę L, akroptylinę i chlorojanerynę oraz mieszaninę laktonów seskwiterpenowych, w skład której wchodziły takie związki, jak cebellina K, cebellina L, cebellina N i cebellina O. Wszystkie wyizolowane substancje miały budowę gwajanolidów.

Natomiast z liści *Centaurea sibirica* wyizolowane i zidentyfikowane zostały 3 związki kumarynowe : kumaryna, skopoletyna i umbeliferon, 2 laktony seskwiterpenowe z grupy gwajanolidów, tj. cynaropikryna i 2',4'-dihydrocynaropikryna oraz glikozyd fenolowy – syryngina.

Do badań mikrobiologicznych mgr kosm. Beata Kamińska przeznaczyła ekstrakty metanolowe z *Centaurea bella* i *Centaurea sibirica* oraz 8 pojedynczych związków (cebellinę A, cebellinę B, cebellinę L, akroptylinę, cynaropikrynę, chlorojanerynę, umbeliferon i syrynginę), a także 2 mieszaniny związków (cebellin K, L, N i O) oraz cynaropikryny i 2',4'-dihydrocynaropikryny). W badaniach użyto 5 grzybów drożdżoidalnych: *Candida albicans*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *Rhodotorula rubra*) oraz 3 dermatofity (*Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* i *Microsporum canis* oraz 1 grzyba pleśniowego – *Scopulariopsis brevicaulis*). Wszystkie szczepy grzybów pochodziły z materiału klinicznego. Badania prowadzone były na podłożu agarowym RPMI, na powierzchni którego posiewano badane szczepy grzybów, a następnie wycinano w nim studzienki. W studzienkach umieszczano badane substancje, rozpuszczone w dimetylosulfotlenku w stężeniu 0,32%, a następnie po określonym czasie inkubacji mierzono średnice powstałych wokół nich stref zahamowania wzrostu badanych grzybów. Na tej podstawie doktorantka oceniała jakościowo aktywność przeciwgrzybiczą ekstraktów, pojedynczych substancji i mieszanin związków wyizolowanych z obu badanych gatunków *Centaurea*.

Badania przeprowadzone przez mgr Beatę Kamińską w ramach rozprawy doktorskiej wyjaśniły dwie kwestie, a mianowicie skład chemiczny mało znanej rośliny *Centaurea sibirica* oraz oceniły działanie przeciwgrzybicze ekstraktów metanolowych i ich głównych składników otrzymanych z *Centaurea bella* i *Centaurea sibirica*.

Badania wykazały, że skład chemiczny liści *Centaurea sibirica* znacznie różnił się od składu *Centaurea bella*. O ile w tej drugiej roślinie występowały głównie laktony seskwiterpenowe z grupy gwajanolidów, substancji charakterystycznych dla rodzaju *Centaurea*, to w *Centaurea sibirica* znaczną część składu stanowiły kumaryny, a laktony seskwiterpenowe występowały w mniejszości. Na tej podstawie autorka rozprawy doktorskiej zaproponowała tę grupę związków jako cechę taksonomiczną dla podrodzaju *Cheirolophus* w rodzaju *Centaurea*.

Z badań mikrobiologicznych wynika, że zarówno ekstrakty metanolowe z liści, jak i wyizolowane z nich substancje odznaczają się działaniem przeciwgrzybiczym. Jednak jakość tego działania była bardzo zróżnicowana. Wśród badanych substancji nie było takiej, która

hamowałyby wzrost wszystkich użytych w badaniach szczepów grzybów. W przypadku ekstraktów metanolowych z liści, znacznie bardziej aktywny okazał się ekstrakt z *Centaurea bella*. Hamował on wzrost 5 z 9 badanych szczepów grzybów. Ekstrakt z *Centaurea sibirica* wykazywał takie działanie tylko wobec 3 szczepów. Z wyizolowanych substancji największą aktywnością przeciwgrzybiczą odznaczały się gwajanolidy: cebellina B, cebelliina L mieszanina cebellin (K, L, N i O), mieszanina cynaropikryny i 2',4'-dihydrocynaropikryny oraz chloroaneryna. Wszystkie te związki hamowały wzrost 6 z 9 badanych szczepów grzybów. Pozostałe substancje, w tym syryngina i umbeliferon wyizolowane z *Centaurea sibirica*, hamowały wzrost mniejszej liczby szczepów.

Patrząc inaczej na badania mikrobiologiczne, z punktu wrażliwości badanych szczepów grzybów na analizowane substancje, można stwierdzić, że największą wrażliwością odznaczały się dermatofity *Trichophyton rubrum* i *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, grzyby drożdżoidalne z rodzaju *Candida fumata* i *Candida glabrata* oraz grzyb pleśniowy *Scopulariopsis brevicaulis*. Pozostałe szczepy grzybów wykazywały mniejszą wrażliwość na badane substancje. Najslabiej hamowały one wzrost szczepów: *Candida albicans*, *Rhodotorula rubra* i *Microsporium canis*.

Taki stan rzeczy wynikał z użycia w badaniach niskich stężeń, zarówno ekstraktów metanolowych z liści *Centaurea bella* i *Centaurea sibirica*, jak i wyizolowanych z nich substancji biologicznie aktywnych. Stężenia tych substancji wynosiły we wszystkich przypadkach 0,32%, tj. 3,2 mg/ml. Użycie wyższych stężeń, w granicach 10-50 mg/ml dałoby prawdopodobnie efekt pozytywny w odniesieniu do wszystkich badanych szczepów grzybów. To znaczy zostałyby osiągnięte stężenia, które zahamowałyby wzrost wszystkich zastosowanych szczepów grzybów chorobotwórczych dla człowieka. Takie badania wymagałyby uzyskania znacznie większych ilości izolowanych substancji, a to w warunkach prowadzonych przez doktorantkę badań było nieosiągalne.

Nie mniej należy podkreślić, że zastosowana przez mgr Beatę Kamińską metodyka była w tych warunkach jedyną z możliwych, a uzyskane wyniki są wartościowe, ponieważ wskazują na potencjalne wykorzystanie ekstraktu z *Centaurea bella* i większości występujących w nim laktonów seskwiterpenowych w charakterze leków przeciwgrzybiczych, zdolnych do zniszczenia zarówno grzybów drożdżoidalnych, dermatofitów, jak i grzybów pleśniowych wywołujących zakażenia u ludzi.

Rozprawa doktorska mgr Beaty Kamińskiej liczy 116 stron i zawiera wszystkie elementy klasycznego opracowania, a mianowicie część teoretyczną, cel pracy, część doświadczalną, omówienie wyników i dyskusję oraz wnioski. Wyróżnia ją dobrze

opracowana strona graficzna, dotycząca szczególnie badań mikrobiologicznych. Praca obejmuje 98 pozycji starannie dobranego piśmiennictwa oraz streszczenie polskie i angielskie.

Z pozycji recenzenta chciałbym jednak poczynić pewne uwagi odnośnie niektórych elementów pracy.

1. Cel pracy jest dość obszerny, zajmuje prawie pół strony. Powinien być sprecyzowany krótko i zwięźle.
2. W części doświadczalnej dotyczącej badań fitochemicznych brak jest informacji o ilości poszczególnych substancji wyizolowanych z ekstraktów metanolowych.
3. W części doświadczalnej obejmującej badania mikrobiologiczne, brakuje następujących informacji;
 - skąd pochodziły szczepy użyte w badaniach; stwierdzenie, że są to szczepy kliniczne nie wyjaśnia pochodzenia szczepów i materiału, z jakiego je wyizolowano,
 - nie podano składu podłoża RPMI, producenta tego podłoża, ani sposobu jego przygotowania do użytku mikrobiologicznego,
 - nie zamieszczono wymiaru studzienek wycinanych w podłożu agarowym, ani jak je sporządzano,
 - w badaniach brak jest kontroli dimetylosulfotlenku na płytkach agarowych (jedna ze studzienek powinna być wypełniona 0,1 ml tego rozpuszczalnika),
 - w tabelach prezentujących aktywność przeciwgrzybiczą badanych substancji znajduje się sformułowanie „wzrost grzyba”, a powinno być „obecność strefy zahamowania grzyba”.
4. Wnioski są w większości zbyt szczegółowe i fragmentami niejasne, np. „Wszystkie analizowane związki wykazały aktywność przeciwgrzybiczą na hodowlach możliwych do oceny”.

Powyższe uwagi nie zmniejszają oczywiście wartości przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej, nie mniej powinny być one brane pod uwagę przy dalszych opracowaniach publikacyjnych.

W świetle przeprowadzonej oceny jednoznacznie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Beaty Kamińskiej jest wykonana rzetelnie. Zaznacza się duży wkład doktorantki w obszarze wykonywania badań oraz ich opracowywania i interpretacji. Uzyskane wyniki znacznie poszerzają naszą wiedzę na temat składu chemicznego *Centaurea sibirica* oraz działania przeciwgrzybiczego ekstraktów i wyizolowanych substancji z *Centaurea bella* i

Centaurea sibirica z perspektywą sporządzenia na ich podstawie preparatów przydatnych w lecznictwie.

W związku z powyższym uważam, że rozprawa doktorska mgr kosm. Beaty Kamińskiej spełnia warunki ustawy dotyczącej stopni i tytułów naukowych i na tej podstawie zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Bogdan Kędzia

Dr hab. n. farm. Bogdan Kędzia, prof. nadzw.