



Wrocław, 16. marca 2017 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pod tytułem

„*Drosera spatulata* Labill. z kultur *in vitro* jako źródło związków o spodziewanym działaniu biologicznym”

której autorką jest pani mgr **Izabela Kędziora**
przedłożonej Radzie Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego

miejsce realizacji rozprawy – **Katedra Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin**
promotor - **prof. dr hab. Jaromir Budzianowski**

Uwagi ogólne na temat problematyki podjętej w rozprawie

Rosiczki (botaniczny rodzaj *Drosera* L.), przyciągają uwagę zarówno biologów roślin i ekologów, jak i farmaceutów czy fitoterapeutów. Z jednej bowiem strony, są one przedstawicielami niepospolitej grupy roślin mięsożernych (owadożernych), dzięki czemu są także dość popularne wśród laików i amatorów botaniki jako ciekawostka przyrodnicza, a z drugiej strony zawierają ciekawe pod względem struktury metabolity, nadające im właściwości lecznicze. Z powodu specyficznego sposobu życia, rośliny te nigdzie nie są w warunkach naturalnych częste, a pozyskiwanie surowca roślinnego do produkcji preparatów oraz do badań naukowych jest ograniczone, choćby przez ochronę gatunkową i siedlisk przyrodniczych.

Z tych powodów temat podjęty przez doktorantkę jest istotny dla wzbogacenia wiedzy o fitochemii jednego z gatunków, a więc i całego rodzaju, a także może pomóc w rozpowszechnieniu kultur *in vitro*, jako sposobu na zapewnienie dostępu do zrównoważonego źródła wysokiej jakości surowca roślinnego. Badania były realizowane w zespole, który ma bogate doświadczenie obydwu głównych kierunkach, czyli w hodowlach *in vitro* komórek i tkanek roślinnych oraz analizie fitochemicznej oraz wyznaczaniu struktury związków naturalnych. Autorka pracy w sposób skuteczny wykorzystwała ogromne doświadczenie promotora i całego zespołu w oczyszczaniu i analizie metabolitów wyspecjalizowanych roślin z rodzaju *Drosera*.

Ocena celu pracy i metodologii badań służącej do rozwiązania podjętych problemów

Nadrzędnym celem badań była weryfikacja założenia o przydatności biotechnologicznej hodowli azjatycko-australijskiego gatunku rosiczki łyteczkowatej do pozyskiwania metabolitów biologicznie czynnych. Do jego realizacji zaplanowano kilka uzupełniających się i kompleksowych zadań badawczych, które zresztą autorka utożsamia z celami. Jest to niestety często popełniany błąd, że drogę do celu określa się jako cel sam w sobie. Najlepszym przykładem tego pomieszenia

pojęć jest podanie w pracy, że celem było założenie kultury *in vitro* i namnożenie roślin, a przecież te zadania to po prostu (i aż) stworzenie narzędzia badawczego i układu eksperymentalnego aby zrealizować cel badań. Nie licząc tego leksykalnego nieporozumienia, autorka bardzo dokładnie wyjaśnia zaplanowane badania oraz uzasadnia kolejne ich etapy, takie jak namnożenie materiału, dopracowanie metody przygotowania i ekstrakcji, wyodrębnienie najważniejszych metabolitów - rossolizydu, 7-metylojuglonu, wykonanie badań bioaktywności. Dodatkowo założono, że w trakcie prac eksperymentalnych mogą zostać pozyskane inne związki o ciekawych właściwościach i/lub wcześniej w tym gatunku nieznanne. Takie założenie dobrze świadczy o naukowym przygotowaniu doktorantki i świadomości ograniczeń, ale i wyzwań pojawiających się w badaniach eksperymentalnych.

Metody wybrane do realizacji celu pracy i poszczególnych zadań badawczych są nowoczesne i adekwatne, aczkolwiek rutynowe w tego typu projektach. Hodowle roślin *in vitro* były zainicjowane z nasion, a aseptycznie uzyskane siewki dostarczyły eksplantatów liściowych, regenerujących w rozetki oraz proliferujących w postaci kultur wielorozetkowych. Dzięki takiemu podejściu, uzyskano wystarczająco dużo materiału do dalszych badań. Autorka próbowała także regenerować korzenie, ale bez sukcesu. Badania fitochemiczne były prowadzone standardowymi metodami, począwszy od ekstrakcji rozpuszczalnikami wraz z wstępnym frakcjonowaniem cieczy, wstępną analizą za pomocą techniki TLC, także dwukierunkowej oraz rozdzielaniem chromatograficznym do celów preparatywnych na kolumnach wypełnionych różnymi złożami. Autorka korzystała zarówno z otwartych kolumn wymywanych grawitacyjnie, jak i w układach ciśnieniowych na mikroskalę (wkłady Sep-Pak) oraz na większą skalę w kolumnach podłączonych do strzykawki. Są to bardzo proste i mało zaawansowane, a przy tym czaso- i pracochłonne metody, niemniej są one niedrogie i jak widać po efektach, mogą także być skuteczne w osiąganiu założonych celów w postaci wyizolowania czystych związków. Do identyfikacji związków otrzymanych w wyniku chromatografii kolumnowej oprócz kochromatografii TLC z wzorcami, wykorzystano powszechnie przyjęte metody spektralne – absorbcja w zakresie UV/VIS oraz NMR, także w wersjach zaawansowanych, jako spektroskopia korelacyjna (COSY, HSQC, HMBC, NOESY, oraz DEPT). Do tego, masy cząsteczek były wyznaczane metodą spektrometrii mas. Uzupełnienie analizy fitochemicznej było określenie zawartości polifenoli redukujących z odczynnikiem Folin-Ciocalteu oraz całkowitej zawartości pochodnych hydroksycynamonowych z odczynnikiem Arnowa. Zawartość naftochinonów oznaczano metodą GC-MS.

Bioaktywność także była przetestowana z użyciem rutynowych metod, szeroko stosowanych w badaniach produktów naturalnych. Cytotoksyczność w stosunku do linii komórkowych była sprawdzana testem MTT, który nie zawsze jest odpowiedni do związków roślinnych, i tak też autorka stwierdziła w przypadku rossolizydu – duża pochwała za przytomność, gdyż często spotyka się w literaturze bezkrytyczne podawanie danych z tego testu jako wiarygodnych wyników. Autorka zmieniła więc sposób detekcji żywotności komórek na błękit trypanowy, otrzymując bardziej sensowne rezultaty. Są to jednak tylko metody wstępnego oszacowania efektu, bez wglądu w mechanizm, na przykład wpływu na cykl komórkowy czy apoptozę. Autorka wykonała więc także test z jodkiem propidyny w technice cytometrii przepływowej. Podsumowując tą część, mogę potwierdzić szerokie kompetencje autorki w doborze metod badawczych – eksperymentalnych i analitycznych, a także ich odpowiednią nowoczesność i wiarygodność w stosunku do założonych celów pracy.

Techniczna i edytorska ocena oraz uwagi do układu rozprawy

Ogółem, praca w formie typowego jednostronnego wydruku, obejmuje łącznie aż 311 stron. Jednakże, część tej okazałej objętości obejmuje dokumentacja w postaci tabel i rycin z danymi spektralnymi (przede wszystkim widma NMR). Łącznie jest to 86 tabel i 116 ilustracji, których spis zamieszczono na końcu pracy, przed Bibliografią. Może warto byłoby rozważyć jakąś nieco bardziej kompaktową formę dokumentowania wyników, ewentualnie część danych eksperymentalnych (np. pomiary przyrostów masy kultur *D. spatulata*, i tym podobne) przedstawić w formie suplementu na końcu pracy, a w tekście głównym podawać średnie z wartościami rozrzutu i/lub prezentować je w formie graficznej).

Praca napisana jest językiem technicznym, dość bogatym, a jednocześnie zwięzłym. Autorka posiada umiejętność prostego wyjaśniania przebiegu wykonywanych czynności. Wszelako, tekst pracy jest przepełniony licznymi drobnymi omyłkami fleksyjnymi, niemalże na każdej stronie. Niestety, funkcja automatycznej korekty, wbudowana w oprogramowanie do edycji tekstów, takich błędów nie wykrywa. Autorka powinna koniecznie dokładać większej staranności przy pisaniu tekstu. Jeżeli Autorka wykazuje skłonność do popełniania takich omyłek, należy po prostu wielokrotnie sprawdzać pracę po napisaniu. Nieco mniej liczne, ale też nadmierne są błędy typograficzne, szczególnie szkodliwe jeśli występują w nazwach np. roślin czy związków. Jednym z przykładów jest też notoryczne pisanie nazwiska autora metody oznaczania hydroksylowych pochodnych phenylopropanoidowych - pana Leslie Earle Arnova przez 'v' w wyrażeniu „odczynnik Arnova”.

Rozprawa jest podzielona na kilka części, bez nadania im numeru rozdziału – Wstęp, Cel i założenia pracy, Część teoretyczna, Część doświadczalna, Omówienie wyników, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie, Spisy tabel i rycin oraz Piśmiennictwo. Ponadto, w Część teoretyczna i Część doświadczalna zostały dodatkowo podzielone na kolejno numerowane rozdziały. Powoduje to pewną niekonsekwencję i nierównomierne rozłożenie rangi poszczególnych części pracy. Ponumerowanie tylko podrozdziałów Cz. teoretycznej i Cz. doświadczalnej powoduje, że ta pierwsza obejmuje rozdziały i sekcje od 1 do 5, a następna od 6 (Metodyka) do 7 (Wyniki), a np. Wstęp, Cel, Dyskusja nie mają żadnego numeru kolejnego. Moim zdaniem, taki system tylko utrudnia odnajdywanie informacji w poszczególnych częściach tekstu. Nie wiadomo właściwie dlaczego odrębne części to „Omówienie wyników” i rozdział 7, nazwany „Badania doświadczalne”, w którym w dodatku umieszczone są informacje należące raczej do „Metodyki”, jak na przykład stężenia i ilości odczynników itp. detale eksperymentalne. Ponadto, w części „Omówienie wyników” znalazła się niezamieszczona w spisie treści sekcja pod tytułem „Badania przeciwnowotworowe - wyniki i dyskusja”.

Wydaje się, że układ pracy powinien być lepiej przemyślany i bardziej konsekwentny. W ocenianej rozprawie, czytelnik nie zawsze mógłby zorientować się którą część aktualnie czyta. Na szczęście, Autorka zrekompensowała ten brak umieszczeniem tytułu części-rozdziału w nagłówku każdej strony wydruku. Ten pomysł zasługuje na pochwałę i powinien być częściej stosowany w rozprawach naukowych, szczególnie tych o okazałej grubości. Wyniki pracy podsumowane są we „Wnioskach”, których jest trzynaście. Są one dość szczegółowe i rozdrobnione. Lepiej byłoby zrobić ich mniej, ale bardziej solidnych. Na przykład, po co aż cztery osobne „wnioski” (12-15) o działaniu kwasu 3-O-acetyloaleuritolowego? Streszczenie w języku angielskim jest niemalże dosłownym tłumaczeniem wersji polskiej, wskutek czego, chociaż w większości gramatycznie i leksykalnie poprawne, nie jest dobre stylistycznie, a przeładowanie konstrukcjami wielokrotnie podrzędnie złożonymi może sprawiać trudności w zrozumieniu angielskiego streszczenia osobom nie znającym polskiej mowy. Ale za to ostatecznie zdanie streszczenia brzmi lepiej po angielsku, niż jego odpowiednik

po polsku! Spis literatury, zamieszczony na samym końcu pracy, jest sporządzony prawidłowo, a publikacje dobrane adekwatnie do tematu i dowodzą dobrego rozeznania w literaturze przedmiotu oraz umiejętności selekcji źródeł. Autorka wykorzystwała wystarczająco dużo pozycji (łącznie ze źródłami internetowymi jest ich 156). Drobne uchybienia polegają na kilku błędach w układzie danych bibliograficznych i pomyłkach typograficznych.

Pozostałe uwagi krytyczne do układu i treści pracy

Poniżej wymienione braki, nieścisłości i omyłki mają w większości charakter terminologiczny, techniczny lub edytorski, więc nie obniżają wartości merytorycznej wykonanych badań. Powinny być jednak koniecznie uwzględnione w przygotowaniu do obrony oraz przyszłych publikacjach autorki.

Uwagi krytyczne chciałbym rozpocząć od tytułu pracy. Jest on bowiem trochę ogólnikowy i nieprecyzyjnie określa zakres pracy w aspekcie „spodziewanego” działania „biologicznego”, podczas gdy badano konkretnie aktywność przeciwnadciwnikową oraz wpływ na proliferację linii komórkowych, a nie tylko działanie „spodziewane”. Jako że autorka nadała większości omawianych związków kolejne numery identyfikacyjne, na które powołuje się w wielu miejscach rozprawy, warto byłoby mieć do dyspozycji zbiorczą tabelę z nazwami i numerami oraz wzorem strukturalnym każdego z tych związków.

W podziale pracy na rozdziały warto byłoby zastanowić się nad przeformułowaniem rozdziałów „Wstęp” i „Cel i założenia” żeby nie było powtarzanych akapitów – strony 13 i 14.

W obszernej i wyczerpującej, a jednocześnie wystarczająco zwięzłej części opisującej stan wiedzy i charakteryzującej obiekt badań (nazwanej dość niezręcznie „częścią teoretyczną” – jest to jednak określenie typowo stosowane w pracach dyplomowych z nauk farmaceutycznych) zawarto mnóstwo wartościowych informacji. Bardzo dobrze, że udało się autorce utrzymać stosowne proporcje między objętością części doświadczalnej i wstępu. Bardzo użyteczna jest tabela zbierająca dotychczas opublikowane doniesienia o roślinkach w kulturach *in vitro* – powinna ona jednak być przeformatowana tak, aby była możliwa do zamieszczenia pionowo na kartce A4 i nie ciągnąć się przez siedem stron. Omówienie fitochemii rodzaju *Drosera* także jest bardzo dobre, tym bardziej że znaczący udział w poznaniu (nomen omen) składu metabolitów miał zespół promotora rozprawy. Pewne zastrzeżenia miałbym jednak do niekonsekwentnej systematyki roślin mięsożernih przestawionej na początku tej części. Mianowicie powołując się na najaktualniejszy układ filogenetyczny, np. publikacje APG, nie powinno się dwuliściennych łączyć z grupą magnoliowych, które stanowią odrębną gałąź (klad) roślin kwiatowych, nie należąc do dwuliściennych. Układ z dość już archaicznego podręcznika z roku 1975, nie odzwierciedla aktualnego stanu wiedzy o pokrewieństwie dużych grup taksonomicznych w obrębie okrytonasiennych.

Pozostałe drobne uwagi w tej części: niejasne zdanie o wynikach badań molekularnych i pozycji rodzaju *Drosophyllum* – rozdz. 3.1 – strona 22; liście pułapkowe *Dionaea* i *Aldrovanda* chyba jednak nie zamykają się pod wpływem impulsu elektrycznego „wysyłanego przez roślinę”; określenie naftochinonów jako związków fenolowych (Tab. 1) jest dość nieścisłe – konwencjonalnie zaliczane są raczej do fitochemicznej klasy chinonów o pochodzeniu poliketydowym, bez pośrednictwa struktur o pojedynczym pierścieniu aromatycznym w odróżnieniu od związków fenolowych, mających w biosyntezie pośrednie etapy C6-C3/C2/C1; nazwę ‘*ros solis*’ mógł wprowadzić pan Arnald de Villa Nova (nie zaś, raczej nieznanym w historii, Arnold de Nillanowa); co to znaczy że „różna zawartość naftochinonów jest uzależniona od organów” albo „mechanizm

działania ... polegający na ... hamowaniu procesów replikacyjnych interakcji wielu białek przez błony komórkowe”??? (str. 34, rozdz. 4.1) albo „Synteza naftochinonów odbywa się na drodze stresu, kiedy na szlaku biosyntezy jest hamowany alkaloid izochinolinę”??? (str. 38); Inny przykład zdania niedorzecznego „Kwas elagowy jest inhibitorem, biorącym udział w tworzeniu raka...” (rozdz. 4.3, str. 60).

Niestety, takich osobliwych sformułowań jest w całej rozprawie stosunkowo dużo. Zaznaczyłem je, podobnie jak błędy gramatyczne i merytoryczne w udostępnionym egzemplarzu rozprawy oraz zaznajomiłem z nimi Autorkę. Tak więc, chociaż praca jako całość dzieła jest merytorycznie poprawna, doradzałbym w przyszłych tekstach naukowych zwracać o wiele więcej uwagi na styl i właściwy dobór słów.

Uwagi merytoryczne do eksperymentalnej części rozprawy

Część eksperymentalna jest najobszerniejsza, stanowiąc objętościowo ponad 2/3 całości i jest to w rozprawach tego typu bardzo pozytywna cecha. W tej części recenzji, w przeciwieństwie do kwestii techniczno-edytorskich, większość uwag będzie miała charakter pochwalny. Autorka włożyła w wykonanie badań ogromny wysiłek, a zakres prac jest zaiste rozległy. Specyfiką pracy i jej wartością są też kultury *in vitro*. Sama część polegająca na optymalizacji technik hodowli w warunkach *in vitro*, ich charakterystyce i przygotowaniu dużej ilości materiału do analiz fitochemicznych była z pewnością czasochłonna i wymagała znaczących umiejętności specjalistycznych. Warto podkreślić, że pani Izabela Kędziora jest absolwentką chemii, więc zagadnienia biotechnologii roślin z pewnością były dla niej nowe. Ciekawą obserwacją w kulturach rozetek *in vitro* było kwitnienie i wytwarzanie nasion. Warto byłoby przy tej okazji spytać, czy kwiaty tych roślin były klejstogamiczne, i czy ewentualnie mogłyby występować tam także agamospermia?

Część fitochemiczna pracy, chociaż oparta na rutynowych metodach, także dowodzi dużego zaangażowania i zdolności opanowania nierzadko żmudnych procedur preparatywnych i analitycznych, oraz przygotowania teoretycznego, szczególnie przy rozwikłaniu dwuwymiarowych widm NMR. Uzupełniając część fitochemiczną badania bioaktywności wykonywane były zarówno w układzie bezkomórkowym *in vitro* (działanie przeciwoxidacyjne), jak i w hodowlach czterech ludzkich linii komórkowych (działanie cytotoksyczne) oraz na komórkach prątka gruźlicy (działanie hamujące wzrost bakterii). Wprawdzie w większości przypadków, wyniki nie wskazały szczególnie imponującego działania wyizolowanych produktów naturalnych, potwierdzając tylko dane z literatury o umiarkowanym działaniu przeciwprątkowym naftochinonów, ich cytotoksycznym działaniu na komórki ssacze, ale niewystarczająco selektywnym żeby sugerować ich zastosowanie kliniczne. Jednakowoż, autorka umiejętnie i rzetelnie przedyskutowała te wyniki i uczciwie odnosi się do ich znaczenia. Pożytkiem dla fitochemii jest niewątpliwie uzupełnienie informacji o składzie metabolitów wyspecjalizowanych rodzaju *Drosera* i badanego gatunku o kilka związków, jak na przykład dwa fitosterole, pochodną kwasu elagowego oraz niewykrywaną wcześniej u *D. spatulata* plumbaginę. Z zaobserwowanych nieścisłości, na stronie 270 (Omówienie wyników) zwraca uwagę informacja o przeliczaniu aktywności antyoksydacyjnej na witaminę C, podczas gdy w tabeli 84 na tejże stronie jest parametr IC_{50} , bardziej zresztą przydatny w interpretacji tego rodzaju aktywności od ekwiwalentu witaminy C.

I to już wszystkie uwagi, które oczywiście wynikają z realizacji obowiązku recenzenta, a nie obniżają mojej wysokiej oceny wykonanych badań i satysfakcji z zapoznania się z wynikami.

Najważniejsze osiągnięcia eksperymentalnej części pracy doktorskiej

- Udowodnienie przydatności kultur *in vitro* *D. spatulata* do pozyskiwania surowca roślinnego bogatego w biologicznie czynne naftochinony, głównie rossolizydu i jego produktu hydrolizy – 7-metylojuglonu;
- Wykazanie dużego wpływu sposobu przygotowania i obróbki materiału roślinnego na zawartość naftochinonów w ekstraktach;
- Wykrycie, zidentyfikowanie i wyizolowanie z *D. spatulata* pentacyklicznego triterpenowego kwasu 3-O-acetyloaleuritolowego oraz zbadanie jego właściwości cytotoksycznych w stosunku do ludzkich linii komórkowych.

Wnioski końcowe

Wszystkie wyszczególnione powyżej uwagi krytyczne i niedoskonałości, chociaż ponadprzeciętnie liczne, mają jednak charakter edytorski i są łatwe do usunięcia albo wyjaśnienia. Nie zmieniają faktu, iż od strony wartości naukowej i rzetelności danych eksperymentalnych praca jest bardzo dobra. Dobrze zaplanowane, przeprowadzone i wnikliwie zinterpretowane analizy i eksperymenty przynoszą dużo informacji wzbogacających wiedzę o możliwości prowadzenia hodowli i mikropropagacji gatunku, jego fitochemii i właściwościach biologicznych wybranych metabolitów. Doktorantka wykazała się doskonałą praktyczną znajomością technik hodowli *in vitro*, izolacji związków czynnych z roślin oraz analizy strukturalnej spektroskopią korelacyjną NMR. Część wstępna rozprawy, gdzie przedstawione zostały podstawy teoretyczne przeprowadzanych badań oraz aktualny stan nauki, pozwalają przekonać się o rzetelnej wiedzy doktorantki w zakresie klasycznej biotechnologii roślin leczniczych oraz metod analizy i preparatyki fitochemicznej.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska, której autorką jest pani mgr Izabela Kędzióra, w pełni kwalifikuje się do przyjęcia przez Radę Wydziału Farmaceutycznego, zgodnie z wymogami odpowiednich przepisów (w tym aktualnej 'Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym...'), określających warunki stawiane rozprawom doktorskim na stopień doktora nauk farmaceutycznych.

Dlatego zwracam się do Rady Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie pani mgr Izabeli Kędziory do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 16. marca 2017 r.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA BIOLOGII I BOTANIKI FARMACEUTYCZNEJ

Kierownik

prof. dr hab. Adam Matkowski