

KRAKÓW , 20.03.2017

Prof. dr hab. Zbigniew Janeczko
Katedra Farmakognozji
Uniwersytetu Jagiellońskiego
Collegium Medicum

RECENZJA

rozprawy doktorskiej zatytułowanej „*Drosera spatulata* Labill. z kultur *in vitro* jako źródło związków o spodziewanym działaniu biologicznym” wykonanej przez mgr chemii Izabelę Kędzioreę w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Promotor pracy: prof. dr hab. n. farm. Jaromir Budzianowski

1. Ocena merytoryczna pracy

Drosera spatulata – rosziczka łyżeczkowata (*Droseraceae*) jest gatunkim występującym głównie w Australii, rzadko spotykanym w Polsce. Na obszarze naszego kraju powszechnie spotykany jest inny gatunek rodzaju *Drosera* - rosziczka okrągłolistna (*Drosera rotundifolia* L.), występujący na glebach bagiennych i torfowiskach. Rosiczki to rośliny owadożerne znajdujące się pod ochroną. Na półkach drogerii i aptek krajów Europy Zachodniej dostępne są preparaty otrzymywane z rosziczki okrągłolistnej m.in. ziele rosziczki, syrop z rosziczki jako leki skuteczne na kaszel. W terapii stosowany jest złożony preparat homeopatyczny o nazwie – *Drosetux*. Surowiec znajduje się w Farmakopei Francuskiej VI (Ph. Gallica VI).

W latach 90-tych ubiegłego stulecia w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej w Poznaniu prowadzone były badania biologiczne i fitochemiczne ziela mało poznanego gatunku rosziczki łyżeczkowanej, które zaowocowały izolacją i ustaleniem struktury szeregu związków pochodnych naftochinonu. Badania zrealizowane przez doktorantkę mgr I. Kędzioreę stanowiły kontynuację wcześniejszych badań i koncentrowały się na izolacji i badaniach strukturalnych związków wyizolowanych z surowca otrzymanego metodami biotechnologicznymi. Co zadecydowało o kierunku i zasadności podjętych przez doktorantkę badań ?.

W celu i założeniach pracy Autorka podkreśla szereg aspektów przemawiających za podjęciem tego tematu m.in. ograniczone występowanie surowca na terenie Polski, bogactwo metabolitów wtórnych pochodnych naftochinonu, kwasu chlorogenowego, flawonoidów, triterpenów i inne. Ważną wskazówką dla podjęcia badań tego gatunku było zastosowanie rosiczki okrągłolistnej w medycynie tradycyjnej. Na szczególne podkreślenie zasługują aktywne biologicznie pochodne naftochinonu: 7-metylojuglon i rossolizyd. W tym miejscu należy podkreślić, iż związki pochodne naftochinonu charakteryzują się nietrwałością i w obecności tlenu ulegają przekształceniu do różnych artefaktów. Fakt ten bardzo utrudniał procedury badań fitochemicznych tej grupy metabolitów. Wymagało to od Doktorantki opanowania skomplikowanych ścieżek analizy chemicznej umożliwiających otrzymanie izolowanych związków w niezmienionej postaci.

Związkom tym przypisuje się aktywność silnie bakteriobójczą w stosunku do gronkowców i paciorkowców, prątków i dwoinek, wywołujących choroby układu oddechowego. Wodne wyciągi z ziela rosiczki stosowane były w medycynie tradycyjnej jako środki przeciwbakteryjne, przeciwkaszlowe, rozkurczowe (spasmolyticum) i uspokajające. Ziele rosiczki stosowano w leczeniu grypy, krztuśca, anginy, gruźlicy, szkarlatyny, stanów zapalnych migdałków, krtani, oskrzeli, gardła i płuc. Podejmowane były próby leczenia raka skóry (w tym celu stosowano maceraty i sok ze świeżego ziela). Wielokierunkowa aktywność rosiczki słusznie zwróciły uwagę Doktorantki na ten surowiec i skłoniły ją do przeprowadzenia analizy składu chemicznego i badań biologicznych rosiczki nowoczesnymi metodami naukowymi. Metody biotechnologiczne, które Doktorantka wdrożyła w swoich badaniach dostarczają możliwości zwiększenia produkcji metabolitów wtórnych, a także wpływają na biogenezę jakościową nie występujących w roślinie metabolitów wtórnych. Dużym sukcesem Autorki było opracowanie metod namnażania roślin w celu otrzymania wystarczającej ilości biomasy liści i korzeni celem wykorzystania w badaniach fitochemicznych. Autorce udało się zoptymalizować metody chemiczne pozwalające na izolację wystarczających ilości metabolitów. W wyniku skomplikowanych metodologicznie zabiegów z materiału otrzymanego technikami biotechnologicznymi wyizolowała 9 związków należących do kilku grup chemicznych i udowodniła ich strukturę nowoczesnymi metodami spektralnymi m. in. $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, COSY, HSQC, HMBC, NOESY, MS, EIMS (GC-MS). Pozwoliło to także na przeprowadzenie badań biologicznych określających aktywność antyoksydacyjną, cytostatyczną i przeciwprątkową tych związków.

Doktorantka we współpracy z innymi ośrodkami naukowymi przeprowadziła testy aktywności cytostatycznej na liniach komórek nowotworowych m. in. raka szyjki macicy, raka jelita grubego oraz raka piersi, powszechnie występujących chorób cywilizacyjnych.. Poziom naukowy badań oceniam na bardzo wysoki, a połączenie badań fitochemicznych z testami biologicznymi uważam za istotne z uwagi na powiązanie badań czysto naukowych z możliwymi aspektami praktycznymi.

2. Ocena metodologiczna pracy

Doktorantka przygotowując się do realizacji eksperymentalnej części pracy zebrała obszerne najnowsze piśmiennictwo (154 pozycje) na podstawie którego opracowała bardzo szczegółowo zagadnienia dotyczące aspektów teoretycznych badanego surowca. Omówiła pochodzenie, występowanie, związki chemiczne obecne w surowcach gatunków rodzaju *Drosera*, zastosowanie w medycynie tradycyjnej jak i aspekty ochrony gatunkowej tego rodzaju. Część doświadczalna posiada prawidłowy układ i podzielona została na 7 podrozdziałów, w których występują dalsze pod- podrozdziały szczegółowo omawiające techniki izolacyjne, analizy spektralne, badania ilościowe oraz badania aktywności antybiotycznej i cytostatycznej. Przygotowany manuskrypt jest bardzo obszerny, obejmuje 310 jednostronnie zadrukowanych arkuszy A-4, praca przygotowana jest starannie, estetycznie posiada bogatą szatę graficzną (116 rycin 86 tabel) znakomicie ułatwiającą śledzenie treści zawartych w opracowaniu. W celu pracy Autorka sformułowała w sposób poprawny cele i założenia pracy, które w sposób logiczny realizuje aby w końcowym etapie przedstawić wyniki przeprowadzonych badań w zwartych wnioskach zawierających najistotniejsze osiągnięcia naukowe. Wskazała także na przesłanki pozwalające przyjąć możliwe praktyczne wykorzystanie wyników przeprowadzonych badań. Badania zostały zakończone sukcesem dzięki zastosowaniu przez Doktorantkę wspomnianych wcześniej nowoczesnych technik badawczych wykorzystywanych powszechnie dla ustalania struktury substancji roślinnych. Samo zastosowanie w. w. metod w analizie fitochemicznej ma jednak sens tylko wówczas, gdy posiada się umiejętność ich wykorzystania przy ustalaniu struktury związków wyizolowanych z materiału roślinnego. Takie umiejętności Doktorantka opanowała w stopniu bardzo dobrym i wykorzystała je perfekcyjnie przy ustalaniu i potwierdzaniu struktury metabolitów wyodrębnionych z materiału roślinnego rosziczki łopatkowatej otrzymanego na drodze biotechnologicznej.

Z uwag, które nasunęły mi się podczas czytania dysertacji wskazać można: str. 51 na rycinie 7 może zamiast [O] lepiej byłoby napisać „tlen” lub „O₂”, na str. 85 może poprawniej byłoby napisać „pod zwiększonym ciśnieniem” zamiast „pod zwiększonym ciśnieniem atmosferycznym”, str. 239 Autorka używa strony osobowej i bezosobowej – czy koniecznie, str. 87, 246, 252 używane jest pojęcie „materiał roślinny zdeintegrowany i niezdeintegrowany” nowe pojęcia w farmakognozji ?, str. 179 czy nie można zastosować innego pojęcia zamiast „rezonujący atom węgla” ?, dla fotografii można było stworzyć odrębne zestawienie. Do danych dotyczących wyizolowanych substancji Autorka zapomniała dołączyć wyniki analiz fizykochemicznych takich jak t. topnienia czy skręcalność właściwa. Powyższe uwagi mają w zasadzie charakter dyskusyjny i nie pomniejszają wartości merytorycznej i poznawczej rozprawy.

Na dorobek mgr Izabeli Kędziory składa się 6 artykułów opublikowanych w czasopismach krajowych i zagranicznych (sumaryczny IF 9,714) oraz 1 artykuł w czasopiśmie krajowym (punktacja Min. Nauki 14,000). Ponadto Doktorantka prezentowała wyniki swoich badań na 17 konferencjach krajowych i zagranicznych.

Wnioski końcowe

W konkluzji chciałbym przedstawić najbardziej znaczące dokonania Doktorantki w przedłożonej do recenzji dysertacji oraz podkreślić jej wartość poznawczą i możliwości aplikacyjne. Badania zostały poprawnie zaplanowane i zrealizowane w pełnym zakresie zgodnie z założeniami postawionymi w celu pracy. Dokonania Autorki wnoszą oryginalny i istotny wkład do wiedzy o gatunku rosziczki łyżeczkowanej, składzie i zawartości metabolitów wtórnych, właściwościach antyoksydacyjnych, cytostatycznych i antybiotycznych. Autorka opracowała metodę namnażania roślin, doprowadziła do otrzymania materiału roślinnego na drodze biotechnologicznej i stwierdziła metodami chromatograficznymi podobieństwo składu chemicznego części nadziemnych i korzeni. W badanym materiale po raz pierwszy wykryła obecność plumbaginy. Po raz pierwszy stwierdziła w gatunku *D. spatulata* obecność triterpenu – kwas 3-O-acetyloaleuritolowego, a także obecność dwóch steroli nowych dla rodzaju *Drosera*, a mianowicie sito- i stigmasterolu. Odkryła, że rossolizyd w obecności tlenu i endogennych enzymów łatwo ulega przekształceniu do odpowiednich artefaktów. Oznaczyła zawartość badanych związków w materiale roślinnym oraz określiła ich aktywność antyoksydacyjną.

Potwierdziła silną aktywność przeciwprątkową ekstraktu heksanowego zawierającego 7-metylojuglon. Z innych właściwości Autorka wykazała aktywność cytostatyczną rossolizydu wobec linii komórek normalnych (MCF12A) przy braku aktywności hamującej na linii komórek HeLaWT, HT29 i MCF7. Odkryła, że kwas 3-O-acetyloaleuritolowy zależnie od stężenia wykazuje efekt hamowania na powyższe linie komórek nowotworowych. Doktorantka wykazała się umiejętnością posługiwania się piśmiennictwem, które zostało poprawnie wykorzystane, opanowała szereg metod analitycznych, fitochemicznych i spektroskopowych jako narzędzi niezbędnych do izolacji i badań strukturalnych związków roślinnych, oznaczyła ich zawartości w materiale roślinnym, a także opanowała metody pozwalające na wielokierunkową ocenę aktywności biologicznej surowca roślinnego. Doktorantka swobodnie porusza się w omawianych zagadnieniach, co wskazuje na bardzo dobre opanowanie warsztatu badawczego z zakresu fitochemii i badań biologicznych.

Reasumując, przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Izabeli Kędziory spełnia ustawowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim na Wydziałach Farmaceutycznych (Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku). W związku z powyższym wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Izabeli Kędziory do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Zbigniew Janeczko

