

Instytut Włókien Naturalnych
i Roślin Zielarskich
ul. Wojska Polskiego 71B
60-630 Poznań

Poznań, 26.03.2018 r.

Ocena

Rozprawy doktorskiej mgr kosm. Agaty Włodarczyk pt. "Kultury *in vitro* *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach i ocena aktywności biologicznej ekstraktów o potencjalnym zastosowaniu kosmetycznym" wykonanej w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Aktualnie istnieje duże zapotrzebowanie na produkty kosmetyczne pochodzenia roślinnego. Konsumenci są przekonani o ich bezpieczeństwie i skuteczności działania. Na przeszkodzie wykorzystania surowców roślinnych w kosmetyce stoją jednak często trudności z ich dostępnością oraz niekiedy duże różnice w składzie chemicznym i działaniu biologicznym. W związku z powyższym sięga się coraz częściej do otrzymywania wartościowych kosmetyków z materiału roślinnego pozyskanego na drodze biotechnologicznej. Służą do tego metody mikrorozmnażania roślin na pożywkach sztucznych, a także hodowle kalusowe i komórkowe. Szczególnie te ostatnie znalazły uznanie kosmetologów ze względu na możliwości pozyskiwania wartościowych, stabilnych chemicznie i farmakologicznie zespołów substancji biologicznie aktywnych.

Jedną z takich roślin, a mianowicie pigwowcem japońskim (*Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach), o potencjalnym zastosowaniu kosmetycznym, zajęła się mgr Agata Włodarczyk.

Celem podjętej przez nią rozprawy było rozmnażanie tej rośliny na drodze biotechnologicznej oraz uzyskanie stabilnych genetycznie hodowli gruntowych, kalusowych i komórkowych. Poza tym doktorantka postanowiła dokonać fitochemicznej oceny jakościowej i ilościowej otrzymanego materiału roślinnego, a także aktywności biologicznej tego materiału pod kątem przydatności kosmetycznej.

Mgr Agata Włodarczyk zajęła się rozmnażaniem pigwowca japońskiego na drodze biotechnologicznej (*in vitro*), poprzez mikrorozmnażanie na pożywkach sztucznych oraz na drodze hodowli kalusowych i komórkowych. Po dezynfekcji nasion otrzymywała ona z nich rośliny pędowe (siewki), których fragmenty (młode liście, liścienie, hypokotyle, korzonki)

służyły do rozwoju nowych roślin pędowych. Na tej drodze autorka uzyskała bardzo dobrą wydajność namnażania, a mianowicie 5,22 roślin pędowych z jednej siewki. Wynik ten był znacznie lepszy od danych piśmiennictwa. Ponadto po ukorzenieniu roślin pędowych na pożywkach syntetycznych przenosiła je do gruntu. W ten sposób otrzymała rośliny gruntowe jednorodne genetycznie z hodowlami pędowymi. Stabilne genetycznie okazały się także 4 linie kalusowe (A1, A2, B i C) wyprowadzone z hodowli pędowych, jak również otrzymane z nich hodowle tkankowe. Wielkość genomu jądrowego DNA była we wszystkich przypadkach jednakowa i wynosiła 1,4 pg/2C.

Warto dodać, że autorka, jako pierwsza założyła hodowle kalusowe i komórkowe dla *Chaenomeles japonica*.

Wstępna jakościowa ocena fitochemiczna polegała na poddaniu ekstraktów etanolowych uzyskanych z owoców, liści rośliny gruntowej, liści rośliny pędowej oraz 4 linii kalusowych badaniom na obecność głównych grup metabolitów wtórnych charakterystycznych dla pigwowca japońskiego. Do tego celu zastosowano jedno- i dwukierunkową chromatografię cienkowarstwową. We wszystkich badanych ekstraktach autorka stwierdziła obecność triterpenów pentacyklicznych (kwasów: ursolowego, oleanolowego i betulinowego), kwasów fenolowych (głównie kwasu chlorogenowego i jego izomerów oraz pochodnych kwasu kawowego), a także śladowych ilości związków flawonoidowych i katechinowych. Występowanie głównych grup metabolitów wtórnych oraz ich wiodących składników potwierdziły przeprowadzone następnie przez doktorankę analizy densytometryczne oraz analizy wykonane za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC).

Następnie mgr Agata Włodarczyk za pomocą analizatorów HPLC i UHPLC sprzężonych ze spektrometrem masowym dokonała ilościowej oceny fitochemicznej ekstraktów etanolowych otrzymanych z owoców, liści rośliny gruntowej, liści rośliny pędowej, 4 linii hodowli kalusowych i hodowli komórkowej wyprowadzonej z kalusa. We wszystkich próbkach badanego materiału roślinnego stwierdzono obecność triterpenów pentacyklicznych oraz polifenoli. Wśród triterpenów pentacyklicznych w dużej ilości występował kwas ursolowy i kwas oleanolowy, a także w niewielkiej ilości kwas betulinowy. W puli związków polifenolowych dominował kwas chlorogenowy oraz w niewielkich ilościach towarzyszył mu kwas dikawoilochinowy. W śladowych ilościach w badanym materiale roślinnym stwierdzono także obecność heksozydu kwercetyny oraz epikatechiny.

W dalszym etapie badań ilościowych w ekstraktach etanolowych wymienionego powyżej materiału roślinnego oznaczono także metodą spektrometryczną ogólną zawartość poli-

fenoli. W największej ilości występowały one w liściach rośliny gruntowej. Znacznie mniejszą zawartość tych związków wykrywano w owocach oraz 4 liniach kalusowych. Kwasy fenolowe, oznaczane metodą kolorymetryczną, występowały w dużej ilości w liściach rośliny gruntowej, a także w stosunkowo dużych ilościach w owocach, liściach rośliny pędowej i kalusie linii A1. W pozostałych liniach kalusowych ich zawartość była niewielka. Z kolei ogólna zawartość związków flawonoidowych, oznaczana metodą kolorymetryczną, była stosunkowo wysoka w liściach rośliny gruntowej oraz liściach rośliny pędowej. Natomiast w owocach i liniach kalusowych stwierdzono tylko śladowe ilości badanych związków.

Końcowym fragmentem badań doktorantki była ocena aktywności biologicznej ekstraktów etanolowych uzyskanych z owoców, liści rośliny gruntowej, liści rośliny pędowej i 4 linii kalusowych *C. japonica*. Badania dotyczyły działania przeciwutleniającego, przeciwdrobnoustrojowego, przeciwpierwotniakowego oraz wpływu na fibroblasty skórne.

W teście DPPH stwierdzono, że wszystkie badane ekstrakty odznaczały się działaniem przeciwutleniającym, przy czym wysoką aktywność przeciwwolnorodnikową wykazywały ekstrakty z owoców, liści rośliny gruntowej, liści rośliny pędowej oraz z linii kalusa C. Również wszystkie badane ekstrakty działały przeciwdrobnoustrojowo w odniesieniu do wzorcowego szczepu gronkowca złocistego (*S. aureus* ATCC 25923). Silne działanie obserwowano w przypadku ekstraktów z owoców i liści rośliny pędowej, słabsze w obecności ekstraktu z liści rośliny gruntowej i kalusa linii A1. Poza tym ekstrakt z owoców pigwowca hamował także wzrost wzorcowego szczepu pałeczki *Escherichia coli*. Natomiast żaden z badanych ekstraktów nie działał na wzorcowy szczep grzyba drożdżoidalnego *C. albicans*. Badania aktywności przeciwpierwotniakowej, prowadzone na pełzaku *Acanthamoeba castellanii* wykazały, że ekstrakty z owoców, liści rośliny gruntowej, liści rośliny pędowej i kalusa linii B odznaczały się silnym działaniem na ten drobnoustrój. Już w niewielkich stężeniach w dużym stopniu hamowały one rozwój trofozoitów tego pełzaka. Natomiast badania nad wpływem testowanego materiału roślinnego na fibroblasty skórne ujawniły, że wysoką aktywnością pobudzającą rozwój tych komórek odznaczał się kalus linii B. W niewielkim stopniu aktywność taką obserwowano także w przypadku ekstraktu z owoców pigwowca.

W podsumowaniu można stwierdzić, że wszystkie cele sformułowane na początku rozprawy doktorskiej zostały przez mgr Agatę Włodarczyk w pełni zrealizowane.

1. Badania biotechnologiczne zakończyły się dużym sukcesem. Rośliny pigwowca japońskiego mikrorozmnażano na podłożu sztucznym z bardzo dobrą wydajnością (z jednej rośliny macierzystej uzyskiwano średnio 5,22 roślin potomnych). Po ukorzenieniu, rośliny udawało się z powodzeniem przenosić do gruntu, co stwarza możliwość zakładania upraw

gruntowych. Natomiast z hodowli kalusowych autorka otrzymywała hodowle komórkowe, które pozwalały na pozyskiwanie cennych substancji biologicznie aktywnych dla celów kosmetologicznych. Warto dodać, że wszystkie rośliny pędowe oraz gruntowe, a także hodowle kalusowe i komórkowe odznaczały się jednorodnością i stabilnością genetyczną.

2. Badania fitochemiczne wykazały, że w roślinach gruntowych i pozyskanych na drodze biotechnologicznej, a także w hodowlach kalusowych i komórkowych pigwowca japońskiego występują głównie triterpeny pentacykliczne i kwasy fenolowe. W niewielkich ilościach towarzyszą im związki flawonoidowe i katechinowe.

3. Na podstawie badań właściwości biologicznych można wnioskować, że ekstrakty otrzymane z roślin gruntowych oraz roślin i hodowli otrzymanych w wyniku zabiegów biotechnologicznych odznaczają się działaniem przeciwutleniającym, przeciwdrobnoustrojowym, przeciwpierwotniakowym i pobudzającym rozwój fibroblastów skóry. Zaobserwowano zróżnicowanie aktywności tych właściwości biologicznych w 4 liniach kalusowych otrzymanych z roślin pędowych pigwowca japońskiego. W związku z powyższym z tych linii kalusowych można pozyskiwać hodowle komórkowe o odpowiednim działaniu biologicznym w kontekście przydatności kosmetologicznej.

Rozprawa doktorska mgr Agaty Włodarczyk liczy 267 stron i zawiera wszystkie elementy klasycznego opracowania, a mianowicie: wstęp, uzasadnienie i cel pracy, część teoretyczną, część doświadczalną, omówienie wyników i dyskusję, podsumowanie wyników i wnioski oraz streszczenie polskie i angielskie.

Rozprawa jest poprzedzona starannie opracowanym wstępem, w którym omówiono zagadnienia związane z klasyfikacją taksonomiczną, charakterystyką botaniczną, pochodzeniem, występowaniem, warunkami siedliskowymi i rozmnażaniem pigwowca japońskiego. Poza tym opisano dokładnie główne metabolity oraz działanie lecznicze i kosmetyczne substancji występujących w tej roślinie. Dodatkowo autorka porusza wybrane typy roślinnych hodowli kalusowych i komórkowych, jako potencjalnych surowców kosmetycznych.

Rozprawę doktorską wyróżnia dobrze opracowana strona dokumentacyjna obejmująca 108 rycin oraz 54 tabele. Piśmiennictwo obejmujące 204 pozycje zostało dobrane w sposób przemyślany.

Na zakończenie chciałbym zwrócić uwagę na zbyt obszerne ujęcie podsumowania wyników i wniosków oraz streszczeń w języku polskim i angielskim. Brak jest w nich wyakcentowania rzeczywistych osiągnięć autorki pracy, które gubią się w szczegółach mniej istotnych dla całości rozprawy, często fragmentów metodycznych i wynikowych. Powyższa uwaga nie umniejsza oczywiście wartości przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej.

W świetle przedstawionej recenzji jednoznacznie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Agaty Włodarczyk jest wykonana i opracowana rzetelnie. Wyraźnie zaznacza się duży wkład twórczy autorki w zakresie wykonywania badań oraz ich opracowywania i interpretacji. Uzyskane przez doktorantkę wyniki badań znacznie poszerzają naszą wiedzę na temat badań biotechnologicznych, składu chemicznego oraz działania biologicznego biomasy *Chaenomeles japonica* w kontekście zastosowania w kosmetologii.

W związku z powyższym uważam, że rozprawa doktorska mgr Agaty Włodarczyk spełnia warunki określone przez ustawę dotyczącą 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., prof. nadzw. Bogdan Kędzia