

Gdańsk, 08.07.2019

dr hab. Aleksandra Królicka, prof. UG
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
UG i GUMed
Pracownia Badania Związków Biologicznie Czynnych
ul. Abrahama 58
80-307 Gdańsk
tel.: 58-523-63-05
aleksandra.krolicka@biotech.ug.edu.pl

RECENZJA

**pracy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Jeziorek
pt. „*Cynoglossum columnae* Ten. – badania biotechnologiczne,
fitochemiczne i biologiczne”.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Biologii Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. farm. Agnieszki Pietrosiuk. Na uwagę zasługuje fakt, że część wyników, które wchodziły w skład rozprawy doktorskiej były wykonane we współpracy międzynarodowej w ramach programu LLP-Erasmus pod kierunkiem prof. dr Ioanny Chinou (Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, Greece).

Rozprawa doktorska składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim oraz 3 artykułów naukowych (w tych 2 prac eksperymentalnych i 1 pracy przeglądowej). Łączny współczynnik cytowalności (ang. *Impact factor*) przedstawionych prac wynosi 8,736, co przekłada się na 95 punktów ministerialnych. Pani mgr Małgorzata Jeziorek jest pierwszym autorem w dwóch publikacjach, a w trzeciej jest drugim autorem. Wyniki pracy doktorskiej prezentowane były również na sześciu konferencjach o zasięgu międzynarodowym.

Dwa artykuły naukowe stanowią jednolitą tematykę badawczą i dotyczą badań biotechnologicznych, fitochemicznych i biologicznych gatunku *Cynoglossum columnae* Ten. (rodzina *Boraginaceae*, ogórecznikowate). Z kolei trzeci artykuł (przeglądowy) dotyczy zastosowania naftochinonów (zawartych również w tkankach *C. columnae*) pozyskiwanych z kultur transformowanych korzeni w terapiach przeciwnowotworowych. Całość przedstawionego dorobku jest spójna i wzajemnie się uzupełnia. Ze względów formalnych doniesienia konferencyjne mimo faktu opublikowania ich w

czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym *Planta Medica* nie mogą być w tym wypadku rozpatrywane.

Ze względu na fakt, że badany w ramach pracy doktorskiej gatunek *C. columnae* należy do rodziny *Boraginaceae*, bogatej w szereg biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych z grupy naftochinonów, alkaloidów pirolizydynowych czy pochodnych kwasu rozmarynowego, podjęcie badań głównie fitochemicznych, biologicznych i biotechnologicznych nad tym gatunkiem uważam za zasadne i niezmiernie ważne. Poszukiwanie nowych źródeł pozyskiwania farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych w dobie narastającej antybiotykoodporności drobnoustrojów oraz chorób nowotworowych jest konieczne. Wprowadzenie przez doktorantkę do kultur *in vitro* śródziemnomorskiego endemicznego gatunku *C. columnae* Ten. pozwoliło jej na uniezależnienie się od warunków klimatycznych, na szczegółową analizę fitochemiczną tego gatunku oraz zbadanie aktywności biologicznej (cytotoksycznej i przeciwbakteryjnej) ekstraktów pozyskanych z roślin rosnących w kulturach *in vitro*. Stwierdzam, że na szczególną uwagę zasługują kultury korzeni anatomicznych *C. columnae* Ten. ze względu na uzyskanie interesujących i cennych wyników, które są podstawą do stwierdzenia, że w przyszłości kultury te mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle biotechnologicznym i farmaceutycznym.

Pierwsza z prezentowanych prac opublikowana w *Industrial Crops and Products* w 2019 roku dotyczy wprowadzenia *Cynoglossum columnae* Ten. do kultur *in vitro* z nasion otrzymanych z Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, które uzyskano dzięki hodowli roślin w ziemi z nasion uzyskanych wcześniej z Grecji. Nasiona po wykiełkowaniu rosły w postaci ukorzenionych pędów. Kulturę *in vitro* korzeni anatomicznych *C. columnae* uzyskano poprzez odcięcie korzeni regenerujących spontanicznie w kulturach *in vitro* pędów. Odcięte korzenie anatomiczne hodowano na wyselekcjonowanej pożywce DCR ze zmniejszoną o połowę zawartością wszystkich składników z dodatkiem 3% sacharozy. Hodowla korzeni na wyżej wymienionej pożywce zaowocowała wytwarzaniem pochodnych szikoniny, widocznych w postaci czerwonego zabarwienia korzeni i pożywki pohodowlanej. Dzięki zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz z detekcją diodową (RP-HPLC DAD) po analizie ekstraktów uzyskanych z korzeni oraz pożywek pohodowlanych stwierdzono obecność sześciu związków o charakterystycznym dla szikoniny i jej pochodnych widmie UV-Vis. Po raz pierwszy w korzeniach i pożywce pohodowlanej korzystając z dodatkowych metod chromatograficznych takich jak: chromatografia cienkowarstwowa (TLC), preparatywna chromatografia cienkowarstwowa (prepTLC), chromatografia kolumnowa (CC,) próżniowa chromatografia cieczowa (VLC) i chromatografia cieczowa ze spektrometrią mas (LC-MS) wyizolowano dwie pochodne naftochinonu, a dzięki zidentyfikowaniu ich struktury metodami spektroskopowymi nadano im nazwy: rinderol (2-methoxy-5O, 6-(isohex-1-ene-1,2-diyI)-5,8-dihydroxynaphthalene-1,4-dione) i cynoglosol (2-[(2S)-5-methyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]-5,8-dihydroxynaphthalene-1,4-dione). Zidentyfikowane dwa barwne naftochinony i n-heksanowy wyciąg uzyskany z pożywki pohodowlanej zostały następnie zbadane pod kątem aktywności biologicznej [cytotoksycznej względem trzech linii ludzkich komórek nowotworowych: HL-60 (ostra białaczka promielocytowa), HeLa (rak szyjki macicy) i HCT-116 (rak jelita

grubego)] oraz przeciwbakteryjnej [bakterie G (+): *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp, oraz bakterie G (-): *Stenotrophomonas maltophilia* i *Proteus* spp.]). Badania wykazały, że rinderol wykazał najwyższą aktywność wobec linii HL-60 ($IC_{50} = 2 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$), a cynoglosol był selektywnie aktywny w stosunku do komórek ostrej białaczki promielocytowej ($IC_{50} = 4,3 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$). Rinderol był również aktywny w stosunku do bakterii *S. epidermidis* (szczep wzorcowy oraz szczep odporny na metycylinę, gdzie stężenia hamujące wzrost gronkowca skórnoego wynosiło odpowiednio 3,91 $\mu\text{g/mL}$ i 7,81 $\mu\text{g/mL}$).

Kolejna praca, opublikowana w *Phytochemistry Letters* w 2016 roku dotyczy analizy fitochemicznej pędów oraz korzeni *C. columnae* Ten. z uprawy gruntowej prowadzonej w Plewiskach pod Poznaniem. Dzięki tej publikacji można prześledzić jakie są różnice w zawartości metabolitów wtórnych syntetyzowanych w roślinach rosnących *in vivo*. Jest to niezmiernie ważne w kontekście hodowli tego gatunku w kulturach *in vitro*. W ekstraktach metanolowych uzyskanych z tkanki roślinnej rosnącej w gruncie i zastosowaniu TLC, chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas oraz analizy spektroskopowej wyizolowano i oznaczono struktury siedmiu związków. W pędach oznaczono: β -arbutynę (co istotne – po raz pierwszy w rodzinie *Boraginaceae*) oraz trzy alkaloidy pirolizydynowe: N-tlenek 2'-epi-heliosupiny, N-tlenek rinderyny i N-tlenek 3'-O-acetylorinderyny. Alkaloidy pirolizydynowe wykazują dużą aktywność biologiczną poprzez działanie toksycznie i genotoksycznie. Z kolei w korzeniach wyizolowano N-tlenek echinatyny, kwas rozmarynowy oraz ester metylowy kwasu litospermowego. Na uwagę zasługuje fakt, że w materiale roślinnym rosnącym w gruncie nie wykazano obecności pochodnych szikoniny. Z tego też względu hodowla korzeni anatomicznych *C. columnae* Ten. w kulturach *in vitro* na pożywce DCR zoptymalizowanej w ramach realizacji pracy doktorskiej jest niezmiernie istotna i zasadna.

Biorąc pod uwagę fakt, że Pani mgr Małgorzata Jeziorek wykazała, że w korzeniach anatomicznych *C. columnae* Ten. hodowanych w kulturach *in vitro* obecne są dwa barwne naftochinony (rinderol i cynoglosol) wykazujące aktywność przeciwnowotworową, próba uzyskania korzeni transformowanych tego gatunku była oczywista. Kultury korzeni włóśnikowatych są bowiem cennym źródłem metabolitów wtórnych o właściwościach biologicznie czynnych, a dzięki możliwości hodowania ich w bioreaktorach rozpyłowych stanowią atrakcyjną alternatywę wobec klasycznych technologii pozyskiwania tych cennych związków. Korzenie transformowane cechuje wysoka stabilność genetyczna i bardzo szybkie przyrosty biomasy. Niestety uzyskane przez Doktorantkę kultury korzeni włóśnikowatych *C. columnae* Ten. nie syntetyzowały pochodnych szikoniny. Jednakże włączenie przez Pani mgr Małgorzatę Jeziorek publikacji przeglądowej dotyczącej wykorzystania kultur korzeni transformowanych do wytwarzania naftochinonów o właściwościach cytotoksycznych w cykl publikacji wchodzących w zakres jej pracy doktorskiej uważam za zasadne. Jest to trzecia praca, w której Doktorantka jest pierwszym autorem. W pracy przeglądowej opublikowanej w *Current Medicinal Chemistry* w 2018 roku Pani mgr Małgorzata Jeziorek korzystając z ponad 90 pozycji literaturowych w przejrzysty sposób przedstawiła obecny stan

wiedzy dotyczący zastosowania transformowanych korzeni do syntezy naftochinonów wykazujących aktywność cytotoksyczną. Pokazała jaki ogromny terapeutyczny potencjał wykazuje rodzina *Boraginaceae*, w której występuje wiele gatunków roślin zawierających szikoninę i jej pochodne (np. *Lithospermum erythrorhizon*, *Lithospermum canescens*, *Arnebia hispidissima* czy *Arnebia euchroma*). W publikacji omówione są warunki hodowli i uzyskane rezultaty pozyskiwania cennych biologicznie naftochinonów. Dodatkowo wartością dodaną jest zebranie informacji dotyczącej informacji związanej z zebraniem nowotworowych linii komórkowych, które były zbadane pod kątem wrażliwości na szeroką gamę naftochinonów.

Podczas obrony pracy doktorskiej chciałabym poprosić Panią mgr Małgorzatę Jeziorek o przedyskutowanie kilku zagadnień:

1. W kontekście aktywności cytotoksycznej, czy zbadano aktywność rindenolu na keratynocytach lub innych komórkach nienowotworowych? Skoro rindenol jest aktywny w stosunku do gronkowca skór nego, to aby ten związek potencjalnie użyć na przykład do zwalczania tejże bakterii trzeba sprawdzić czy nie jest toksyczny dla komórek zdrowych.

2. Jaka była wydajność transformacji *C. columnae*? Ile uzyskano klonów i czy do transformacji stosowano tylko jeden szczep agropinowy ATCC 15834? Jakie startery zostały zastosowane do potwierdzenia transformacji na poziomie molekularnym? Jaka może być przyczyna, że korzenie transformowane nie syntetyzowały rindenolu i cynogłosolu?

3. Czy Doktorantka próbowała hodowli korzeni anatomicznych i transformowanych *C. columnae* Ten. na świetle? Jeśli były podjęte takie próby, to czy badała ona uzyskany materiał roślinny pod kątem analizy fitochemicznej?

4. Czy były podjęte badania dotyczące elicytacji metabolitów wtórnych zawartych w tkankach *C. columnae* z zastosowanie elicytorów abiotycznych bądź biotycznych? Jeśli nie, to jaką elicytację mogłaby zaproponować Doktorantka w kontekście danych literaturowych dotyczących na przykład podwyższania poziomu naftochinonów w roślinnych kulturach *in vitro*?

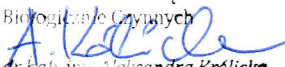
5. Czy Doktorantka badała aktywność przeciwbakteryjną ekstraktów pozyskanych z całych roślin *C. columnae* Ten., czy tylko sprawdzała aktywność rindenolu obecnego w korzeniach anatomicznych? Jeśli nie było takich badań, to czy w świetle doniesień literaturowych w ocenie Doktorantki można się spodziewać efektu synergii pomiędzy obecnością alkaloidów pirolizydynowych i kwasów fenolowych w ekstraktach z tkanek *C. columnae* Ten. w walce z bakteryjnymi patogenami człowieka?

Podsumowując recenzent stwierdza, że prezentowane w pracy doktorskiej wyniki i ich interpretacja są wystarczającym materiałem dla uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych. Oświadczenia autorów pokazały, że wkład Pani mgr Małgorzaty Jeziorek w powstanie 3 prac przedstawionych w rozprawie doktorskiej był wiodący i znaczący, a dodatkowym argumentem jest fakt, iż doktorantka jest pierwszym autorem w dwóch publikacjach, a w trzeciej drugim autorem. W mojej ocenie Pani mgr Małgorzata Jeziorek uzyskała bardzo ciekawe wyniki o interesującej wartości naukowej i aplikacyjnej.

Poszerzenie wiedzy fitochemicznej o niezbadany dotąd w tym zakresie gatunek rośliny jakim jest *Cynoglossum columnae* Ten. i wykazanie jego potencjału dotyczącego wytwarzania związków biologicznie aktywnych (barwnych naftochinonów) jest doskonałym materiałem wyjściowym do dalszych badań związanych z wytwarzaniem cennych metabolitów wtórnych w kulturach korzeni anatomicznych. Należy również wspomnieć, że Pani mgr Małgorzata Jeziorek jest również współautorem pięciu innych prac o zasięgu międzynarodowym, które nie są związane z tematem jej pracy doktorskiej, a jej indeks Hirscha wynosi 5. Świadczy to o szerokich zainteresowaniach badawczych Doktorantki.

Uważam, że opisany udział Pani mgr Małgorzaty Jeziorek w powstanie trzech prac naukowych o zasięgu międzynarodowym zaprezentowanych do recenzji upoważnia mnie do stwierdzenia, że rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Jeziorek spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim (określone w Art. 13 punkt 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595 i test jednolity Dz. U. 2016, pozycja 882, 1311). Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie naukowej. Na uwagę zasługuje również fakt, że publikacje, które są wynikiem pracy doktorskiej były już cytowane przez środowisko naukowe 5-cio i 6-cio krotnie, mimo faktu, że ukazały się drukiem stosunkowo niedawno, bo w 2016 i 2018 roku.

W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Jeziorek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Pracowni Badania Związków
Biologicznie Czynnych

prof. UG, dr hab. inż. Aleksandra Królicka