



Dr hab. n. farm. Łukasz Kuźma
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej
Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź
lukasz.kuzma@umed.lodz.pl

Łódź, dn. 08.07.2019 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Jeziorek pt.:

„*Cynoglossum columnae* Ten. - badania biotechnologiczne, fitochemiczne i biologiczne”.

Rozprawa doktorska, którą miałem zaszczyt recenzować zrealizowana została przez Panią mgr Małgorzatę Jeziorek w Zakładzie Biologii Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Leczniczych na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Praca doktorska, będąca przedmiotem mojej recenzji, została wykonana pod kierunkiem promotorskim Pani Prof. dr hab. Agnieszki Pietrosiuk. Niniejsza praca doktorska składa się z wykazu publikacji i doniesień zjazdowych tematycznie obejmujących pracę doktorską, wprowadzenia stanowiącego szczegółowe kompendium opisujące dotychczasowy stan literaturowy wiedzy dotyczący gatunku *Cynoglossum columnae* Ten., a zwłaszcza wytwarzanych przez ten gatunek metabolitów wtórych z grupy naftochinonów oraz alkaloidów pirolizydynowych. Kolejną część rozprawy stanowił cel pracy, będący zbiorem jasno postawionych hipotez stanowiących algorytm ścieżki badawczej Doktorantki, które dalej opisuje w części "Podsumowanie Wyników", a ich opis finalizuje ostatecznie w podrozdziale "Wnioski - Weryfikacja Hipotez". Do całości Doktorantka zamieściła piśmiennictwo cytowane we wcześniejszych częściach niniejszej rozprawy. W dalszej części pracy Doktorantka zamieściła zbiór pełnotekstowych publikacji i streszczeń doniesień zjazdowych obejmujących tematycznie rozprawę doktorską, następnie - oświadczenia współautorów oraz streszczenie pracy w języku polskim i angielskim. Ostatnim rozdziałem recenzowanej pracy jest wykaz publikacji i doniesień zjazdowych niewchodzących w zakres pracy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę fakt, że gatunek *Cynoglossum columnae* Ten. nie był wcześniej badany jako hodowany w warunkach *in vitro* oraz że może być on cennym źródłem biologicznie czynnych naftochinonów, alkaloidów pirolizydynowych i fenolokwasów, wybór

tego gatunku do badań oraz obrona przez Doktorantkę ścieżka eksperymentalna, w mojej ocenie, są w pełni uzasadnione.

Na dorobek naukowy wchodzący w zakres pracy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Jeziorek składają się trzy publikacje, które biorąc pod uwagę, m.in. ich sumaryczny wskaźnik Impact Factor (wg. najnowszych danych bibliometrycznych) wynoszący **9,503**, są imponujące. Uzyskane w ramach pracy doktorskiej wyniki były prezentowane także w formie streszczeń prezentowanych na sześciu międzynarodowych konferencjach. W dwóch publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, w jednej również autorem korespondencyjnym i w jednej publikacji drugim autorem.

W załączonej do rozprawy doktorskiej publikacji nr 1 (Industrial Crops & Products 2019, 137, 446-452) Pani mgr Jeziorek opisuje uzyskanie kultury sterylnych siewek *Cynoglossum columnae* Ten., z których następnie otrzymała i zapoczątkowała kulturę korzeni nietransformowanych tego gatunku. Hodowaną w warunkach *in vitro* kulturę korzeni prowadziła w wstrząsanych orbitalnie kolbach Erlenmeyera w płynnym sterylnym podłożu ½ DCR (pożywka ze zredukowaną o połowę masą makro- i mikroelementów) suplementowanym sacharozą w stężeniu 30 g/litr. Każdy z kolejnych cykli hodowlanych trwał 60 dni. Z ekstraktów z podłoży pohodowlanych oraz korzeni *C. columnae*, technikami chromatograficznymi (TLC, TLC preparatywna, CC, VLC) po raz pierwszy wyizolowała i zidentyfikowała (techniką NMR, LC/MS/MS oraz RP-HPLC-DAD) dwa barwne związki o strukturze naftochinonu, tj. rinderol (2-metoksy-5-okso,6-(izoheks-1-en-1,2-diylo)-5,8-dihydroksynaftaleno-1,4-dion) oraz cynoglosol (2-[(2S)-5-metylo-6-okso-3,6-dihydro-2H-pirano-2-ylo]-5,8-dihydroksynaftaleno-1,4-dion). Związki te następnie poddała badaniom biologicznym pod kątem aktywności cytotoksycznej wobec linii ludzkich nowotworów HL-60 (linia białaczkowa), HeLa (nowotwór szyjki macicy) i HCT-116 (nowotwór jelita grubego). Oba związki wykazują znaczną aktywność cytotoksyczną wobec testowanych linii komórkowych. Przykładowo, wartości IC₅₀ badanych substancji wobec linii HL-60 wynosiły 2,0 i 4,3 µg/ml odpowiednio dla rinderolu i cynoglosolu. Pod kątem wspomnianej aktywności, Pani mgr M. Jeziorek badała także heksanowy ekstrakt z podłoża pohodowlanego ½ DCR i stwierdziła jego wysoką aktywność (wartość IC₅₀ poniżej 6 µg/ml) wobec linii HCT-116 i HL-60. Rinderol odznaczał się także wysoką aktywnością przeciwbakteryjną wobec *Staphylococcus epidermidis* (ATCC oraz MRSE) – wartości MIC dla tego związku oscyływały w przedziale 3,9 do 7,8 µg/ml.

Biorąc pod uwagę fakt, że wyizolowane związki wykazują wysoką aktywność biologiczną (co przy wzrastającej liczbie zachorowań na choroby nowotworowe oraz rosnącej antybiotykooporności skłania do poszukiwań nowych leków) oraz są zdolne do przenikania z korzeniowych komórek roślinnych do podłoża hodowlanego, kultura korzeni nietransformowanych *C. columnae* może być interesującym źródłem cennych związków farmakologicznie czynnych z grupy naftochinonów. Warto podkreślić, że dyfundowanie tych naftochinonów do pożywki znacząco upraszcza i obniża koszty pozyskiwania tych metabolitów – pozwala uniknąć czasochłonnego suszenia korzeni, mikronizacji, ekstrakcji, puryfikacji itd..

Publikacja nr 2 (Current Medicinal Chemistry 2018, 25, 4718-4739) włączona w poczet prac w zakresie pracy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Jeziorek jest pozycją o charakterze przeglądowym, w której Doktorantka sumiennie zebrała i opisała najnowszą literaturę światową (92 pozycje cytowane) traktującą o korzeniach włośnikowatych (transformowanych), jako cennego źródła aktywnych przeciwnowotworowo naftochinonów. Publikacja ta jest cennym kompendium wiedzy, stanowiącym wartościową pomoc dla innych badaczy, którzy posiłkując się tą pracą mogą z powodzeniem uniknąć często żmudnych poszukiwań niezbędnej literatury dotyczącej naftochinonów wytwarzanych w kulturach korzeni modyfikowanych genetycznie. Dlatego, publikację tę oceniam jako znaczącą wartość dodaną pracy Doktorantki.

W publikacji nr 3 (Phytochemistry Letters 2016, 15, 234-237) Doktorantka poddała badaniom fitochemicznym rosnącą w warunkach glebowych roślinę *Cynoglossum columnae* Ten.. Z ekstraktu metanolowego, technikami chromatograficznymi (LC i VLC) sumarycznie wyizolowała i zidentyfikowała siedem związków z różnych części rośliny. W nadziemnych częściach rośliny wykryła trzy alkaloidy pirolizydynowe, mianowicie: *N*-tlenek 2'-epi-heliosupiny, *N*-tlenek rinderyny i *N*-tlenek 3'-acetylorinderyny. Ponadto, w tej części rośliny zidentyfikowała β -arbutynę. W korzeniach *C. columnae* natomiast stwierdziła obecność jednego alkaloidu pirolizydynowego - *N*-tlenku echinatyny oraz dwóch fenolokwasów: kwasu rozmarynowego i metylowego estru kwasu litospermowego. Biorąc pod uwagę powszechnie znaną różnorodną aktywność biologiczną w/w metabolitów, niniejsza praca, w mojej ocenie, stanowi wysoką wartość naukową, gdyż dostarcza cennych danych dotyczących zarówno procedury fitochemicznej, jak i wiedzy o tym, do biosyntezy których związków jest zdolna dana część rośliny.

Podczas realizowania przez Panią mgr Małgorzatę Jeziorek ścieżki doświadczalnej nad kulturą *Cynoglossum columnae* Ten., fakt że biosynteza naftochinonów w korzeniach transformowanych tego gatunku uległa wyciszeniu, był jak sądzę niezbyt miłą niespodzianką. Sugerując kontynuację badań nad tą kulturą, mam do Doktorantki dwa pytania, mianowicie:

1. Korzenie transformowane często intensywnie realizują metabolizm pierwotny (wzrost, podziały komórkowe). Czy zatem próbowała Pani jeszcze wydłużyć cykl wzrostu celem „przeczekania” okresu intensywnego wzrostu korzeni włóśnikowatych i wymuszenia przejścia kultury na metabolizm wtórny, w tym być może naftochinonów?
2. Czy próbowała Pani hodowli dwufazowej korzeni włóśnikowatych (podłoże wzrostowe i produkcyjne z ewentualną suplementacją elicytora), w tym także w aeroponicznym bioreaktorze?
3. Czy badała Pani wpływ światła na wzrost i biosyntezę naftochinonów w korzeniach modyfikowanych genetycznie?

Po przeanalizowaniu zastosowanych przez Doktorantkę różnych metod chromatograficznych, w tym kontekście mam jedno pytanie. Otóż:

4. Biorąc pod uwagę często skomplikowane i kosztowne procedury rozdzielowe realizowane zarówno na płytkach chromatograficznych, jak i na kolumnach szklanych, czy rozważała Pani możliwość zbierania rozdzielonych metabolitów semipreparatywnie na HPLC? Podpowiem, że można to robić bez konieczności posiadania kosztownego w zakupie kolektora frakcji.

Podsumowując moją recenzję pracy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Jeziorek, chciałbym podkreślić fakt, że z załączonych oświadczeń współautorów publikacji wchodzących w zakres niniejszej rozprawy wynika znaczący wkład Doktorantki w ich powstanie. Na uwagę zasługują także publikacje niewchodzące w zakres pracy doktorskiej, a których sumaryczna wartość Impact Factor = 8,656 (MNiSW 120) robi wrażenie. Świadczą one także o rozległych zainteresowaniach naukowych Doktorantki, co daje dobre perspektywy dalszego rozwoju naukowego Pani mgr Jeziorek.

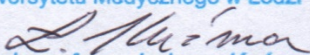


Uzyskane przez Panią mgr Małgorzatę Jeziorek w ramach pracy doktorskiej wyniki mają charakter nowatorski, gdyż dostarczają nowych, wartościowych danych o *Cynoglossum columnae* Ten. dotyczących zarówno rośliny rosnącej w gruncie, jak i hodowanej w warunkach *in vitro*. Dane te, w mojej ocenie, mogą mieć znaczący aspekt praktyczny, szczególnie zważywszy na zdolność dyfuzji naftochinonów z kultury korzeni do podłoża hodowlanego, co daje szansę na wykorzystanie też prostej i taniej ścieżki ekstrakcyjnej na szeroką skalę.

Uważam, że praca doktorska Pani mgr Małgorzaty Jeziorek spełnia wymagania stawiane kandydatom do stopnia doktora określone Ustawą o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki. Niniejszym, uważam za miły obowiązek uprzejmie poprosić Wysoką Radę Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Jeziorek do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz nagrodzenie Jej pracy stosownym wyróżnieniem.

Z poważaniem

KIEROWNIK
Zakładu Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi


dr hab. n. farm. Łukasz Kuźma