



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biochemii



dr hab. Anna Szakiel, prof. ucz.
Zakład Biochemii Roślin

Warszawa, 2023-01-05

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Kłeczek

pt. „Analiza fitochemiczna wybranych roślin z plemienia Inuleae
– izolacja wtórnych metabolitów o potencjalnym działaniu przeciwbakteryjnym,
przeciwzapalnym i cytotoksycznym oraz wstępna ocena ich aktywności”

przygotowanej w Zakładzie Fitochemii
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja

Polskiej Akademii Nauk w Krakowie
pod kierunkiem dr hab. Anny Stojakowskiej

Podstawą formalną recenzji jest uchwała nr 15/XVI/18 Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk z dnia 11 grudnia 2018 r.

Przedstawiona do recenzji dysertacja liczy 300 stron, obejmuje wstęp, cel pracy, część teoretyczną (podzieloną na rozdziały poświęcone roślinom plemienia Inuleae oraz rodzajom *Xerolekia* i *Carpesium*; ten fragment rozprawy dotyczy systematyki i charakterystyki botanicznej badanych roślin oraz aktualnego stanu wiedzy o zawartości metabolitów wyspecjalizowanych) oraz część eksperymentalną, podzieloną na kolejne dwie części, dotyczące analizy fitochemicznej oraz badań aktywności biologicznej; a następnie dyskusję, wnioski oraz streszczenie (w języku polskim i angielskim). Rozprawa zawiera także dodatek z danymi spektralnymi, spis tabel, spis rysunków i schematów, spis stosowanych skrótów oraz bibliografię, złożoną z 539 pozycji literaturowych. Doktorantka zamieściła w rozprawie także dodatkowe informacje o finansowaniu badań, otrzymanym stypendium doktoranckim KNOW (Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego)

finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz listę publikacji zawierających opisane w rozprawie wyniki badań.

Zgodnie z tytułem rozprawy, głównym celem podjętych badań było wyizolowanie i identyfikacja wyspecjalizowanych metabolitów dwóch gatunków roślin należących do plemienia Inuleae: unikalnego alpejskiego endemitu *Xerolekia speciosissima* (L.) Anderb. i rośliny leczniczej pochodzącej z Dalekiego Wschodu *Carpesium divaricatum* Sieb. & Zucc., a także przeprowadzenie testów przesiewowych w kierunku aktywności biologicznej wyizolowanych związków. Przeprowadzono także analizę porównawczą profilu metabolitów polifenolowych zidentyfikowanych w *X. speciosissima* z profilami tych związków występującymi w blisko spokrewnionych gatunkach *Telekia speciosa* (Schreb.) Baumg. i *Buphthalmum salicifolium* L., co doprowadziło do ważnych wniosków chemotaksonomicznych; zaś przeprowadzona analiza fitochemiczna *C. divaricatum* miała dodatkowo na celu sprawdzenie, czy roślina ta, uprawiana w polskich warunkach klimatycznych, pozostanie wartościowym źródłem charakterystycznych dla tego gatunku związków bioaktywnych.

Podjęty temat uważam za bardzo interesujący i istotny z punktu widzenia naukowego, gdyż przeprowadzone badania fitochemiczne przyczyniły się do znaczącego poszerzenia wiedzy o zawartości metabolitów wyspecjalizowanych w badanych roślinach (w tym identyfikacji nowych związków), a badania aktywności biologicznej, zwłaszcza właściwości przeciwzapalnych, wskazały na interesujący potencjał leczniczy *X. speciosissima* i doprowadziły do potwierdzenia tradycyjnych zastosowań *C. divaricatum*.

Rozpoczynająca rozprawę część teoretyczna jest bardzo obszerna (92 strony), została przygotowana w oparciu o bogatą, właściwie dobraną literaturę naukową (można odnieść wrażenie, że Doktorantka zebrała jeśli nie wszystkie, to na pewno znakomitą większość publikacji dotyczących omawianych zagadnień) i zawiera wiele cennych, szczegółowych informacji zarówno z dziedziny botaniki i systematyki plemienia Inuleae i należących do niego wybranych gatunków roślin, jak i klasycznej fitochemii i etnofarmakologii. Rozdziały poświęcone zastosowaniom badanych roślin i syntetyzowanych przez nie bioaktywnych metabolitów wyspecjalizowanych nie tylko w medycynie tradycyjnej, ale także współczesnej: w surowcach zielarskich, lekach i suplementach diety, uważam za bardzo interesujące i wartościowe. Cała część teoretyczna została wzbogacona w liczne i starannie opracowane przypisy, w których Autorka zawarła dodatkowe wyjaśnienia i komentarze do głównego tekstu.

Część eksperymentalna została podzielona na dwie części (A i B), dotyczące odpowiednio analizy fitochemicznej i badań aktywności biologicznej. Taki podział spowodował brak typowego dla rozpraw doktorskich wyodrębnienia jednej, zwartej części metodycznej i kolejnej, poświęconej omówieniu wyników. Zważywszy jednak na złożoność i wieloetapowość zastosowanych analiz, a następnie wykonanie testów bioaktywności nie z zastosowaniem całych ekstraktów lub ich subfrakcji, ale czystych, wyodrębnionych związków, trzeba uznać taki niekonwencjonalny podział treści za logiczny i bardziej klarowny.

Metody wybrane zarówno do analiz fitochemicznych, jak i oznaczeń aktywności biologicznych są nowoczesne, a ich dobór właściwy, w pełni adekwatny do wyznaczonych celów i umożliwiający ich realizację. Do frakcjonowania otrzymanych ekstraktów Doktorantka zastosowała wieloetapową analizę chromatograficzną, opartą zarówno na różnych technikach chromatografii adsorpcyjnej, jak i preparatywnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (semiprep. RP-HPLC-UV). Identyfikację i analizę strukturalną związków przeprowadziła z wykorzystaniem takich metod jak analityczna wysokosprawna chromatografia cieczowa (RP-HPLC-UV), ultrasprawa chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (UHPLC-DAD-MS), wysokorozdzielcza spektrometria mas (HRESIMS) i spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Badając aktywności biologiczne zastosowała test krążkowo-dyfuzyjny Kirby-Bauer do badań właściwości przeciwbakteryjnych (który został wykonany na dwóch szczepach gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus*, wrażliwego i niewrażliwego na metycylinę); test przesiewowy w kierunku aktywności przeciwzapalnej z wykorzystaniem neutrofilii izolowanych z ludzkiej krwi obwodowej (badania obejmowały oznaczenie cytokin prozapalnych i wolnych rodników) oraz testy aktywności cytotoksycznej (MTT i LDH) na liniach komórek nowotworowych (m.in. nowotworu kości, prostaty, jelita grubego i czerniaka) oraz liniach normalnych, niezmienionych nowotworowo. Eksperymenty zostały zaplanowane z uwzględnieniem adekwatnych prób kontrolnych. Zastosowane metody są opisane klarownie i przejrzystie, na uwagę zasługują zwłaszcza starannie opracowane schematy przeprowadzonych analiz fitochemicznych, które ułatwiają zrozumienie wieloetapowych procesów chromatograficznego frakcjonowania ekstraktów i analizy strukturalnej wyizolowanych związków, oraz tabele z zestawieniami frakcji w odniesieniu do składu fazy rozwijającej. Otrzymane dane spektralne identyfikowanych związków, w postaci widm ^1H NMR, zostały zebrane jako wyodrębniony dodatek do rozprawy.

Otrzymane wyniki analiz fitochemicznych obejmują szczegółowe charakterystyki (nazwy chemiczne, wzory strukturalne i sumaryczne, wybrane właściwości) zidentyfikowanych związków oraz opisy interpretacji chromatogramów i uzyskanych danych spektralnych. Wyniki badań aktywności biologicznej zostały przedstawione w postaci zdjęć, wykresów i tabel; analizy aktywności cytotoksycznej obejmują m.in. wyliczenie wartości IC_{50} z wykorzystaniem programu AAT Bioquest. Wyniki zostały prawidłowo opracowane statystycznie za pomocą pakietu Statistica 13 z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Dunnetta.

Zwieńczeniem rozprawy jest obszerna i interesująca dyskusja, której szczególnie interesującą częścią są rozdziały poświęcone aktywności biologicznej wybranych metabolitów wyizolowanych z badanych surowców roślinnych; rozdziały te zostały opracowane (podobnie jak część teoretyczna rozprawy) w oparciu o bogatą literaturę naukową. Doktorantka przedstawiła w tej części m.in. różne hipotezy dotyczące mechanizmów działania przeciwzapalnego i przeciwnowotworowego badanych związków.

Reasumując, za najbardziej wartościowe osiągnięcia naukowe przedstawione w recenzowanej rozprawie należy uznać:

- przeprowadzenie charakterystyki fitochemicznej niezbadanego wcześniej pod względem chemicznym alpejskiego endemitu *Xerolekia speciosissima*, która doprowadziła do m.in. do zidentyfikowania grupy monoterpenuidowych pochodnych tymolu (wśród nich związków nieopisanych wcześniej w literaturze), flawonoidów, pochodnych kwasu kawowego (kwasów kawoiloheksarowych i kawoilochinowych) oraz ich estrów, a w częściach nadziemnych tej rośliny dodatkowo laktonów seskwiterpenowych i apokarotenoidu;
- przeprowadzenie analizy porównawczej profilu metabolomicznego *Xerolekia speciosissima* z profilami blisko spokrewnionych gatunków *T. speciosa* i *B. salicifolium*, która umożliwiła potwierdzenie słuszności ostatnio przyjętej klasyfikacji taksonomicznej z wyodrębnieniem *Xerolekia* jako nowego rodzaju monotypowego; z kolei wykazanie występowania w korzeniach *X. speciosissima* kwasu leontopodowego podważyło znaczenie tego związku jako markera chemofenetycznego plemienia Gnaphalieae (do którego zaliczana jest m.in. szarotka alpejska);
- przeprowadzenie charakterystyki fitochemicznej *Carpesium divaricatum*, która wykazała występowanie obok znanych laktonów seskwiterpenowych typu germakranu także

oksyliny (kwasu *trans*-12-okso-fitodienowego, 12-OPDA) oraz znacznych ilości pochodnych kwasu kawowego i ich estrów;

- przeprowadzenie badań aktywności biologicznej na wyizolowanych, czystych związkach (trzech monoterpenoidowych pochodnych tymolu otrzymanych z *X. speciosissima* oraz trzech laktonów seskwiterpenowych i kwasu 12-OPDA otrzymanych z *C. divaricatum*), badania te wskazują na znaczące aktywności przeciwzapalne niektórych związków (m.in. jednej z pochodnych tymolu, izomaślanu, oraz kwasu 12-OPDA) i nieselektywną aktywność cytotoksyczną o mechanizmie niezależnym od białka p53 testowanych germakranolidów.

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach recenzowanej rozprawy mają istotną wartość chemotaksonomiczną i wnoszą nowe dane fitochemiczne, gdyż doprowadziły do identyfikacji związków nieznanych dotąd z występowania w naturze, zaś niektóre zidentyfikowane związki opisano po raz pierwszy jako metabolity roślin należących do badanych taksonów. Badania aktywności biologicznych wykazały potencjał leczniczy *X. speciosissima* i potwierdziły tradycyjne zastosowania *C. divaricatum*.

Obowiązkiem recenzenta jest także zauważenie niedociągnięć rozprawy.

W części teoretycznej pojawia się określenie „wyspecjalizowane metabolity wtórne”. Wydaje się, że Doktorantka chciała tu pogodzić tradycyjny podział metabolitów roślinnych na pierwotne i wtórne (ang. *primary and secondary*) oraz nową klasyfikację na podstawowe i wyspecjalizowane (ang. *basic and specialized*). Nowa klasyfikacja toruje sobie drogę z dużym trudem, zarówno w polskiej literaturze naukowej, jak i anglojęzycznej, można się więc spodziewać, że podział metabolitów na pierwotne i wtórne jeszcze nieprędko zniknie z publikacji, a nawet podręczników. Niemniej należy raczej unikać takich podwójnych określeń, bo natychmiast rodzi się pytanie, które metabolity wtórne są niewyspecjalizowane.

W pewnym sensie kontrowersyjne jest stwierdzenie ze streszczenia rozprawy, gdzie Doktorantka pisze, że „opierając się na danych etnobotanicznych zakres poszukiwań związków o potencjale leczniczym można zawęzić do roślin używanych w medycynie ludowej”. W jakimś sensie tezie tej zaprzecza sama rozprawa, w której podjęto analizę fitochemiczną rośliny endemicznej o niezbadanym dotąd składzie metabolitów wyspecjalizowanych. To prawda, że etnofarmakologia jest bogatym źródłem inspiracji badawczych, ale zapewne fitochemicy jeszcze nie raz podejmą trud przeprowadzenia analiz ekstraktów z roślin niestosowanych w medycynie tradycyjnej, nawet jeśli jedynym

powodem będzie zwykła ciekawość badawcza, i nie można wykluczyć, że takie badania mogą doprowadzić do identyfikacji nowych związków bioaktywnych.

Cała rozprawa jest starannie zredagowana i napisana poprawnym językiem naukowym, typowe literówki i niedociągnięcia redakcyjne są bardzo nieliczne. Natomiast uważam, że nadmierną ostrożnością było unikanie przenoszenia długich, wielocłonowych nazw chemicznych między wersami tekstu, bo prowadziło to do niezamierzonych efektów, jak zbyt wielkie spacje między wyrazami w poprzedzającym wersie, lub konieczność przypadkowego przeniesienia kilku końcowych liter w nazwach o długości przekraczającej pojedynczą linijkę tekstu (w jednym przypadku była to jedna litera). Wydaje mi się, że nie jest błędem wykorzystanie naturalnych fragmentów nazw chemicznych, dzielonych przecież myślnikami, do ich przenoszenia, dzięki czemu tekst zyskuje bardziej zwarty, spójny wygląd.

Powyższe uwagi nie mają żadnego wpływu na wysoką ocenę merytoryczną rozprawy.

Podsumowując - uważam, że temat podjęty w recenzowanej rozprawie doktorskiej jest istotny i wartościowy, cele zostały wytyczone poprawnie, zastosowane metody są nowoczesne i adekwatnie dobrane, doświadczenia prawidłowo zaplanowane i starannie przeprowadzone, a uzyskane wyniki są oryginalne i interesujące. Doktorantka wykazała się samodzielnością, rozległą wiedzą, umiejętnością doboru i korzystania z literatury naukowej oraz planowania eksperymentów i samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Natalii Kłeczek p.t. „Analiza fitochemiczna wybranych roślin z plemienia Inuleae – izolacja wtórnych metabolitów o potencjalnym działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwzapalnym i cytotoksycznym oraz wstępna ocena ich aktywności” stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, świadczy o nabyciu dogłębnej wiedzy teoretycznej i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Kandydatkę oraz spełnia wszystkie warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017

r., poz. 1789), jak i warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668).

W związku z powyższym, przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk **wniosek o dopuszczenie Pani mgr Natalii Kłeczek do dalszych etapów przewodu doktorskiego** *[wszczętego na podstawie przepisów Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1669, art. 179, ust. 2) i Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018, poz. 261)].*

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny recenzowanej rozprawy i wartość naukową przeprowadzonych badań, wnioskuję o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Natalii Kłeczek**. Wniosek o wyróżnienie uzasadniam szerokim zakresem i pracochłonnością przeprowadzonych badań (były to m.in. analizy fitochemiczne wymagające wieloetapowych procedur chromatograficznych, prowadzące do identyfikacji kilku grup metabolitów, w tym związków oznaczonych po raz pierwszy; trzeba także podkreślić, że badania aktywności biologicznych zostały przeprowadzone na wyizolowanych związkach); wyróżniającą się jakością i oryginalnością otrzymanych wyników (zostały one opublikowane w czterech artykułach w renomowanych czasopismach z listy JCR o wysokich współczynnikach bibliometrycznych), a także walorami poznawczymi rozprawy (na szczególną uwagę zasługuje tu część teoretyczna, która ma charakter obszernej monografii o badanych roślinach).