



## INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirsfelda

Polska Akademia Nauk

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (4871) 370 9982, fax: (4871) 370 9975

<http://iitd.pan.wroc.pl>; e-mail: [gamian@iitd.pan.wroc.pl](mailto:gamian@iitd.pan.wroc.pl)

Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych

Wrocław, 1.02.2017 r.

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej

Prof. dr hab. Andrzej Gamian

### Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Rafała Ziewieckiego pt. „Sposób otrzymywania roślinnych koniugatów polifenolowo-polisacharydowych, a ich struktura i właściwości antykoagulacyjne” wykonanej pod kierunkiem prof. zw. dr hab. inż. Romana Gancarza

Poszukiwanie związków pochodzenia roślinnego o ustalonej budowie, zdefiniowanej aktywności biologicznej i mechanizmach działania jest ciągle wyzwaniem dla wielu badaczy, ze względu na zapotrzebowanie w medycynie i rosnące wymagania jakościowe. Przedstawiona do oceny praca dotyczy opracowania nowego sposobu otrzymywania i analizy z kilku roślin leczniczych, makrocząsteczek o właściwościach antykoagulacyjnych. Badania nad wydzielaniem substancji roślinnych o określonych aktywnościach biologicznych są prowadzone w świecie, jednak wciąż procedury otrzymywania związków wymagają doskonalenia, dostosowywania do nowych możliwości analitycznych, warunków technologii produkcji, standardów jakości tak, aby produkt posiadał określoną czystość, ustaloną budowę bez jego degradacji, wysoką aktywność w niższych dawkach, co stanowi problemy do rozwiązania. Badania takie są ważne z punktu widzenia biomedycznego, gdyż opracowanie metodologii pozwoli na poszukiwanie nowych związków w innym materiale roślinnym, dlatego też podjęcie tematu jest uzasadnione. Należy podkreślić, że surowiec roślinny stawia przed badaczami specyficzne wymagania opracowania odrębnej metodologii. Stąd temat podjęty jest bardzo aktualny, istotny też ze względu na potrzebę wprowadzania nowych alternatywnych antykoagulantów o swoistym mechanizmie działania. Niniejsza praca jest kontynuacją programu badań prowadzonych w Zakładzie Technologii Organicznej i Farmaceutycznej na Wydziale Chemii Politechniki Wrocławskiej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma układ stosowany w pracach doświadczalnych, typowy dla rozprawy doktorskiej i zawiera 180 stron maszynopisu, w tym 45 tabel i 61 rysunków, 551 pozycji piśmiennictwa, w większości (60%) z ostatniej dekady, ponadto wykaz stosowanych skrótów.

We wstępie pracy nazwanym przeglądem literaturowym autor wprowadza czytelnika w zagadnienia polisacharydów, glikoprotein, proteoglikanów i glikolipidów aby na tym tle omówić

glikokoniugaty roślinne. Następnie interesująco pokazuje polisacharydowe antykoagulanty zwierząt, alg i roślin wyższych, po przedstawieniu mechanizmu krzepnięcia krwi. Osobno omawia sposoby otrzymywania polisacharydów, warunki ekstrakcji, krytycznie opisuje poszczególne parametry stosowanych procesów. Wreszcie charakteryzuje główne metody badań struktury polisacharydów, w tym spektroskopii UV-VIS, FT-IR, NMR, także GLC-MS. Wstęp pracy jest dobrze skonstruowany, napisany czytelnie, wszystkie części przyporządkowane przedmiotowi badań, z właściwie dobranym piśmiennictwem. Wstęp mógłby być opublikowany jako praca przeglądowa ze względu na duży stopień trudności jaki sprawiają glikozaminoglikany, natomiast tutaj zostały pokazane pewne aspekty metodyczne, strukturalne, funkcjonalne i technologiczne.

Za cel badań wytyczono otrzymanie glikokoniugatów roślinnych z koszyczków rumianku pospolitego, analizę chemiczną i właściwości antykoagulacyjnych produktów preparacji, porównanie takich produktów z kilku innych roślin, a następnie ulepszenie metody preparacji produktów aby otrzymać związki działające bardziej specyficznie, wreszcie dobranie frakcji o wysokiej czystości i selektywnym działaniu wobec określonych czynników szlaku krzepnięcia krwi. Cel został rzeczowo sprecyzowany i konsekwentnie realizowany w pracy.

Część eksperymentalna zawiera spis materiałów, odczynników oraz metod stosowanych podczas badań. Opis metod badań i eksperymentów jest poprawny, podany w sposób wyczerpujący. Dobór metod jest trafny dla realizacji zadań. Najpierw opisano proces ekstrakcji i oczyszczania aktywnej mieszaniny, po czym modyfikację tej metody, dalej metody analityczne po czym przedstawiono kilka różnych testów badania aktywności antykoagulacyjnych, interakcji z białkami osocza metodą plazmonowego rezonansu powierzchniowego. W ramach biologicznych badań mechanizmów aktywności antykoagulacyjnych przeprowadzono analizę hamowania działania kilku czynników metodami wcześniej opisanymi oraz zmodyfikowanymi przez autora, testów zarówno *in vitro* jak też z użyciem szurzego modelu zwierzęcego.

Otrzymane wyniki przedstawiono jasno i rzeczowo, zostały dobrze udokumentowane na rycinach i w tabelach, każdy rozdział jest poprzedzony krótkim wprowadzeniem. Wpierw określono kilkoma testami właściwości antykoagulacyjne wytypowanego i wydzielonego preparatu z rumianku, oraz jego skład chemiczny. Tutaj pojawia się pytanie czy surowiec w postaci linii komórkowej lub sadzonek z danej linii mógłby być lepszym materiałem wyjściowym niż surowiec z różnych stanowisk. Produkt wykazywał swoiste oddziaływanie z antytrombiną, co potwierdzono w testach w układzie dynamicznym. Następnie autor otrzymał preparaty z ziela poziomki, jeżyny i kwiatu głogu, z których preparat z poziomki wykazywał swoistą aktywność antykoagulacyjną przez wiązanie z kofaktorem heparyny II. Następnie autor zmodyfikował metodę preparacji substancji aktywnej poprzez wstępne odtłuszczenie materiału, zaniechanie użycia chloroformu, a wprowadzenie aparatu Soxhleta z etapem ultrafiltracji, co pozwoliło na uzyskanie aktywnego preparatu, polepszenie procesu technologicznego i wydajności. Każdy etap badań otrzymywania aktywnych frakcji produktu był analizowany pod względem aktywności antykoagulacyjnych, oddziaływania z czynnikami tego szlaku, przybliżania mechanizmu



działania, badania składu chemicznego szerokim panelem metod. W rezultacie autor poprawił metodykę otrzymywania swoistej aktywnej frakcji, otrzymał zdefiniowany produkt i dopracował metodykę analizy otrzymanego materiału. Tutaj pojawiają się pytania, czy próbowano używać żywie jonowymiennych do frakcjonowania lub doczyszczania takich produktów, oraz czy jest możliwe uzyskanie podobnych aktywnych związków w warunkach niealkalicznych bez degradacji alkalilabilnych funkcji być może korzystnych, czyli jak dalece produkt odbiega od natywnego składnika wydzielanego innymi sposobami ekstrakcji.

Dyskusja jest dobrze przeprowadzona, kolejne doświadczenia i wyniki są omawiane krytycznie zarówno w części badawczej jak i w podsumowaniu wyników, metody i wyniki są porównane do danych z piśmiennictwa. Poszczególne etapy pracy są rzeczowo uzasadniane i konsekwentnie i logicznie wyciągane wnioski z kolejnych doświadczeń służą całościowej realizacji zamierzonego celu. Autor w oparciu o wcześniej uzyskane wyniki Zespołu i dane z piśmiennictwa opracował procedurę otrzymywania i analizy preparatu leczniczego o aktywności antykoagulacyjnej. Badania te będą kontynuowane *in vivo* ze względu na zapotrzebowanie na tego rodzaju nietoksyczne terapeutyki. Pytania które nasuwają się dotyczą analizy masy cząsteczkowej metodą chromatografii podziałowej SEC, dlaczego użyto wody skoro w roztworze soli uzyskano lepszy rozdział, tak jak na rys. 3.4.1.1, gdzie skądinąd przydatny byłby wykres UV-VIS, co pozwoliłoby na bardziej zdecydowane twierdzenie że mamy do czynienia z koniugatem polisacharydowo-polifenolowym.

Uwagi krytyczne natury redakcyjnej zostały zaznaczone na marginesie pracy i chociaż nie mają znaczenia merytorycznego i nie wpływają na ogólną bardzo dobrą ocenę pracy, należy je odnotować i uwzględnić przed wysłaniem manuskryptu do druku. Na rycinie 1.1.1 podano błędnie anomerie disacharydów, na str. 9 niezbyt fortunny wydaje się termin „wytrawianie metanolem” może lepiej „traktowanie metanolem”, na str. 16 powinno być „3-deoksy-D-manno-2-oktulozonowy”, także na str. 50, w tabeli 1.4.1.1.1 mowa o 6-deoksyheksozach, na str. 17, l. 6 od góry, powinno być „resztami acylowymi”. Na str. 18 jest mowa o powstawaniu koniugatów za pośrednictwem wiązań wodorowych i hydrofobowych, podczas gdy cytowane prace [40-42] mówią raczej o kompleksowaniu polifenoli z polisacharydami. Należy sprawdzić na str. 19 l. 1 od góry wartość 2000000 kDa. W tabeli 1.2.3.1 oraz 4.3 należy podać nazwy rodzajowe organizmów. Na str. 51 i innych skrótowo zapisana jest chromatografia gazowo-cieczowa, a w rozwinięciu mowa o gazowej. Pochodne są silylowe. Lepszy jest termin biosensor jak na str. 78 niż sensorchip. Na str. 80 niejasny jest drugi akapit, w którym zdania są niekopletne, także w tabeli 3.2.4.1. Na rys. 3.1.6.2 korekty wymaga podpis jednego z czynników. Na str. 132 odnosi się do rozdziału 3.3.6, ale nie ma takiego w pracy. Na str. 149, powierzchniowy rezonans plazmonowy, spektroskop IR, na str. 155 spektrometria masowa, dalej, nie jest jasne przy neutralizacji roztworu NaOH przez NaOH, na str. 153 czy roztwór fenolu był o stężeniu 9g/ml, na następnej str. wzór sumaryczny  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  lepiej podać dokładniej, na str. 155 redukcja i acetylacja hydrolizatu zamiast preparatu roślinnego, na str. 157 mowa o zdrowym pacjencie, w poz. 309, 328

piśmiennictwa zmieniono nazwiska. Uwagi te wynikają z obowiązku recenzenta, ale nie wpływają na wartość merytoryczną ocenianej pracy.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że praca jest wartościowa, została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana, wnosi nowe elementy do wiedzy o substancjach roślinnych o określonych aktywnościach biologicznych, metodologii ich pozyskiwania w skali technologicznej. Autor wprowadził kilka modyfikacji do metod preparacji i analizy, zastosował szeroki panel metod charakterystyki otrzymywanych substancji zarówno biologicznych jak też chemicznych przez co praca pozwala przybliżyć zastosowanie uzyskanych produktów. Wypracowane w tej pracy warunki otrzymywania i analizy antykoagulantów stanowią cenne źródło danych referencyjnych. Doktorant wykazał się znajomością piśmiennictwa, które jest właściwie wykorzystane, co dowodzi swobodnego poruszania się w omawianym zagadnieniu. Uzyskane wyniki mają duże znaczenie aplikacyjne.

Uważam, że rozprawa mgr Rafała Ziewieckiego zawiera oryginalny materiał doświadczalny i spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki. Dlatego wnioskuję do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr Rafała Ziewieckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Pozwolę sobie złożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie tej pracy ze względu na dużą wartość merytoryczną i bardzo dobre wykonanie części doświadczalnej rozprawy.

KIEROWNIK  
Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych  
  
Prof. dr hab. Andrzej Górnian