

Recenzja pracy doktorskiej mgr Rafała Ziewieckiego pt. „Sposób otrzymywania roślinnych koniugatów polifenolowo-polisacharydowych, a ich struktura i właściwości antykoagulacyjne”, wykonanej w Zakładzie Technologii Organicznej i Farmaceutycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej

Wraz z szybkim rozwojem technik analitycznych i chromatograficznych, poszukiwanie nowych preparatów roślinnych o wysokiej aktywności biologicznej staje się przedmiotem zainteresowania wielu środowisk akademickich i przemysłowych. Zespół prof. Romana Gancarza z Zakładu Technologii Organicznej i Farmaceutycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej od lat jest aktywny w tej dziedzinie badań.

Mgr. Rafał Ziewiecki pod kierunkiem prof. Gancarza wykonuje pracę doktorską zatytułowaną „Sposób otrzymywania roślinnych koniugatów polifenolowo-polisacharydowych, a ich struktura i właściwości antykoagulacyjne”. Jest to kontynuacja jego pracy dyplomowej wykonywanej również pod kierunkiem prof. Gancarza. Skierowanie uwagi Promotora i Doktoranta na choroby układu krążenia jest ze wszech miar uzasadnione, jednakże argument, że są one przyczyną 31% wszystkich zgonów na świecie, bez odniesienia do wieku kiedy następuje zejście, nie dociera do mnie, choćby ze względu na fakt, że wszyscy kiedyś musimy zakończyć życie. Zatem, jeśli dzięki postępowi medycyny średni czas życia wydłuży się do 90 – 100 lat, a choroby układu krążenia będą główną przyczyną odejścia z tego świata, nie widziałbym w tym nic złego. Abstrahując od tego niezbyt szczęśliwego uzasadnienia, nie ulega wątpliwości, że choroby układu krążenia są problemem dzisiejszej populacji, choćby dlatego, że średni czas życia znacznie się wydłużył, a nie akceptujemy odejścia z tego świata w wieku kiedy dopisuje sprawność fizyczna i intelektualna. Nie ulega wątpliwości, że nietoksyczne preparaty roślinne, które są dobrze tolerowane przez organizm człowieka i mogą być przyjmowane każdego dnia, zapewniając utrzymanie układu krążenia w dobrym stanie, to na pewno bardzo dobry kierunek badań.

W części ogólnej pracy Doktorant charakteryzuje tzw. glikokoniugaty, do których zalicza się glikoproteiny, proteoglikany, glikolipidy i glikokoniugaty polifenolowe. Biorąc pod uwagę cel pracy, obszerny fragment poświęca Doktorant polisacharydom o właściwościach antykoagulacyjnych, do których przede wszystkim należy heparyna i pokrewne polisacharydy zawierające kwasy uronowe i grupy siarczanowe. Omawia mechanizm krzepnięcia krwi. Szczególną uwagę kieruje na antykoagulanty wyodrębniane z roślin wyższych. Podobnie jak heparyny zawierają one kwasy uronowe, a także wiele innych popularnych monosacharydów, nie zawierają jednak reszt siarczanowych, lub posiadają je w znikomych ilościach. Ich cechą charakterystyczną są aglikony polifenolowe.

Kolejne fragmenty części ogólnej pracy Doktorant poświęca sposobom wyodrębniania polisacharydów, a więc technikom ekstrakcji, doboru rozpuszczalnika i temperatury. Omawia również techniki badań strukturalnych glikokoniugatów, takich jak spektroskopia UV-VIS, IR i NMR, a także metody chromatograficzne połączone z MS.

Nie ukrywam, że układ recenzowanej pracy jest dla mnie zaskoczeniem, ponieważ cel pracy przedstawia Doktorant dopiero po części ogólnej. Rozumiem, że złożony charakter badań skłonił Doktoranta do odwrócenia kolejności. Dla mnie część ogólna/literaturowa powinna jednak wynikać z zamierzeń Doktoranta, być konsekwencją przyjętego celu pracy, zatem powinna być umieszczona w drugiej kolejności.

Pierwszym obiektem badań mgr. Ziewieckiego są koszyczki rumianku pospolitego. Materiał roślinny zostaje poddany znanej w Zespole procedurze izolowania biologicznie aktywnych składników prowadząc do produktu oznaczonego **M1**, który Doktorant analizuje na obecność polifenoli, cukrów, kwasów uronowych i białek potwierdzając w ten sposób skład zbliżony do opisanych już wcześniej w literaturze. W preparacie dominują polifenole i cukry proste takie jak: glukoza, galaktoza, ksyloza, arabinoza, ramnoza, a także kwasy gluko- i galaktouronowe. Materiału białkowego jest poniżej 1%. Wstępna ocena właściwości preparatu *in vitro*, a potem też *in vivo* wykazała, że nie jest toksyczny. Kolejno przeprowadza mgr. Ziewiecki szereg standardowych testów oceniających właściwości wyodrębnionego preparatu. Odnotowuje działanie antykoagulacyjne, chociaż słabsze od wzorców. Doktorant przeprowadził również badania oddziaływań preparatu z wybranymi białkami kaskady krzepnięcia. Preparaty zostały poddane ocenie przez wykonanie widm IR i ¹H NMR, które umożliwiają jedynie odnotowanie charakterystycznych grup

funkcyjnych i podstawników takich jak aromatyczne aglikony, grupy hydroksylowe, karboksylowe, czy też terminalne grupy metylowe ramnozy i fukozy. Myślę, że więcej danych dostarczyłyby widma ^{13}C NMR, ale wykonane przy pomocy aparatu o znacznie wyższym polu.

Badania *in vivo* na zwierzętach zostały wykonane w Katedrze Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, po akceptacji przez Lokalną Komisję Etyczną do spraw Doświadczeń na Zwierzętach.

Szczególną uwagę poświęca Doktorant badaniom otrzymanych preparatów z białkami kaskady krzepnięcia krwi, badania te zostały wykonane w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej, a nie Państwowej, Akademii Nauk. Do analizy oddziaływań z wybranymi białkami, Doktorant używał sensor-chipów typu CM5. W toku analiz wykonanych przy pomocy biosensorów, Doktorant zaobserwował oddziaływania pomiędzy preparatem z rumianku M1 a immobilizowanymi białkami – trąbiną i antytrombiną.

Kolejnymi surowcami roślinnymi, które zostały poddane badaniom to: poziomka pospolita, jeżyna fałdowana i głóg jednoszyjkowy. Preparaty do badań, odpowiednio **F1**, **R2** i **C3**, zostały wyodrębnione w podobny sposób i poddane podobnym testom. Wykazały również zbliżoną aktywność. Preparat z rumianku **M1** na tle pozostałych okazał się być najbardziej swoisty w działaniu inhibitorowym w kompleksie a antytrombiną wobec czynnika IIa. Podobne właściwości wykazywał preparat z poziomki, który dodatkowo wykazał się najbardziej swoisty wobec kofaktora heparyny II.

Analiza wyników badań skłoniła Doktoranta do wprowadzenia modyfikacji do wypracowanego w Zespole sposobu wyodrębniania. Zmiany te polegały na przesunięciu etapu odtłuszczenia materiału, rezygnacji z użycia rozpuszczalników chlorowcowych i użycie aparatu Soxhleta z workiem dializacyjnym. W efekcie w trzech przypadkach uzyskano preparaty o słabszej aktywności antykoagulacyjnej w porównaniu z procedurami niemodyfikowanymi. Wyjątkiem był preparat z koszyczków rumianku **M-3e** dla którego aktywność była porównywalna z preparatem **M1**. W tej sytuacji Doktorant, przy pomocy dializy, poddał ten preparat usunięciu związków o małych i średnich ciężarach cząsteczkowych otrzymując **M-m3**, który miał mniejszą ilość polifenoli, a dwukrotnie wyższą ilość cukrów, w tym połowę stanowiły kwasy uronowe. Ten makrocząsteczkowy produkt stał się obiektem dalszych prac badawczych. W testach *in vitro* preparat **M-m3** wykazał dwukrotnie wyższą aktywność antykoagulacyjną od preparatu **M1**. Dalsze optymalizacje

procedury umożliwiły zwiększenie sumarycznej wydajności wyodrębnienia preparatu **M-m3** do około 7%. Preparat ten zawierał trzy frakcje o stosunkowo wysokiej aktywności. Otrzymana drogą chromatografii najbardziej interesująca frakcja **M-f1**, która stanowiła 2.3%, zawierała w części polisacharydowej kwas galaktouronowy, a także ksylozę, galaktozę i arabinozę.

Doktorant wykonał ogromną pracę, demonstrując znakomite opanowanie nowoczesnych metod separacji preparatów biologicznych. Z trudnością mogę jednakże ocenić rozmiar wykonanej pracy, ponieważ nie zajmuję się wyodrębnianiem ani polisacharydów, ani glikokoniugatów. Podziwiam Doktoranta, że zdecydował się osobiście wykonywać tak złożone badania, a nawet podjąć bezpośrednią asystę przy doświadczeniach na zwierzętach,.

Trzeba w tym miejscu przypomnieć, że celem Doktoranta było poszukiwanie aktywnych antykoagulacyjnie preparatów, a nie izolowanie określonych związków i ich pełna charakterystyka strukturalna, która uwzględnia miejsca połączenia jednostek sacharydowych, a także konfiguracje wiązań glikozydowych. Dlatego mgr. Ziewiecki identyfikuje jedynie obecność zdefiniowanych monosacharydów i kwasów uronowych. Procentowy udział składników w części polisacharydowej, a także procentowy udział polifenoli. określa techniką GC-MS, po uprzedniej hydrolizie, redukcji i acetylowaniu mieszaniny. Istotnym elementem pracy jest, przede wszystkim, zdefiniowana, możliwa do powtórzenia procedura wyodrębniania preparatu, a także określenie jego aktywności i porównanie jej z aktywnością znanych związków, z grupy heparyn.

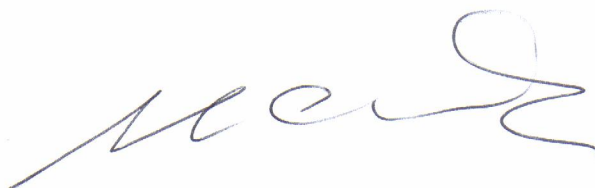
Wyodrębnione przez Doktoranta preparaty otwierają dalsze możliwości badań. Dają one duże szanse na znalezienie rośliny i sposobu izolowania preparatu polifenolo-polisacharydowego, który oferowałby wysoką aktywność i możliwość użycia w terapii schorzeń układu krążenia.

Jestem pod wrażeniem liczby różnorodnych testów starannie wykonanych przez mgr. Ziewieckiego, które charakteryzują aktywność wyodrębnionych frakcji glikokoniugatów. Materiał zgromadzony w pracy jest obszerny i interesujący. Interpretacja wyników badań aktywności przekonywująca. Praca jest dobrze napisana i zredagowana, ma staranną szatę graficzną, znalezione drobne błędy nie zmieniają mojej wysokiej oceny recenzowanej pracy.

Warto też przypomnieć, że mgr. Ziewiecki jest również współautorem kilku publikacji i licznych doniesień konferencyjnych, krajowych i zagranicznych.

Wprawdzie podobnych rozpraw doktorskich jak ta, która podejmuje wyodrębnianie i ocenę aktywności biologicznej naturalnych preparatów, nie recenzowałem w przeszłości, jednakże, biorąc pod uwagę bogaty materiał i sposób jego przedstawienia uważam, że rozprawa mgr. Rafała Ziewieckiego zasługuje na wyróżnienie.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Rafała Ziewieckiego spełnia znakomicie wymagania Ustawy o Tytule Naukowym i Stopniach Naukowych i w konsekwencji wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'R. Ziewiecki', written in a cursive style.