



Opole 16 sierpnia 2017

dr hab. Jacek Lipok, prof. UO

### OCENA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Ewy Klepacz,  
pt.: „Naturalne polifenole i ich glikozydy jako związki kompleksujące jony wapnia i ich  
potencjalne zastosowanie w terapii kamicy nerkowej”,  
wykonanej w Zakładzie Technologii Organicznej i Farmaceutycznej  
Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej,  
pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Romana Gancarza

Poszukiwanie nowych leków, skutecznych w terapii coraz powszechniej diagnozowanych chorób, jest jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się sfer aktywności badawczej. Jeżeli zaś poszukiwania dotyczą substancji aktywnych pozyskiwanych ze źródeł naturalnych, o ustalonej renomie w tzw. medycynie ludowej, efekty tych działań – leki pochodzenia naturalnego, zyskują szczególną aprobatę chorych i cieszą się zainteresowaniem przedsiębiorstw farmaceutycznych.

Przedstawiona do oceny praca dotycząca poszukiwań naturalnego preparatu roślinnego, który mógłby być stosowany w terapii kamicy nerkowej, jest bardzo dobrym przykładem holistycznego podejścia do problemu badawczego. Pani mgr inż. Ewa Klepacz wykorzystwała dostępne informacje naukowe oraz przekazy medycyny ludowej do wytypowania określonych organów roślin zawierających poszukiwane substancje, po czym określiła wybrane właściwości ekstraktów z tych matryc, pod kątem oddziaływania na modelowe i rzeczywiste złoże wapniowe występujące w układzie moczowym.

Chęć pełnego przedstawienia wielowątkowego toku badań znalazła odzwierciedlenie w obszerności dysertacji, która liczy dwieście trzynaście (213) numerowanych stron oraz trzydzieści (30) stron nienumerowanych (załącznik) zawierających fotografie, chromatogramy, widma i tabele. Te ostatnie chociaż z nagłówkiem „Tabele korelacje” są w istocie zestawieniami grup danych i niestety nie zawierają informacji uzasadniających taki ich tytuł. Chęć prezentacji wszystkich uzyskanych wyników jest naturalną cechą młodych badaczy, szkoda jedynie, że w przypadku niniejszej dysertacji, zbiory danych, szczególnie

fotografii i chromatogramów, prezentowane w załączeniu, nie zawierają informacji umożliwiających ich należytą identyfikację. Nie towarzyszą im bowiem ani tytuły, ani legendy odnoszące się do konkretnych doświadczeń i omówionych wcześniej wyników. Nie pomaga w tym również „Spis treści”, utworzony głównie z równoważników zdań, a przez to ogólnikowo informujący o zawartości wyróżnionych części pracy. Kontynuując omówienie kompozycji dysertacji Pani mgr inż. Ewy Klepacz, chciałbym wrócić uwagę na brak streszczenia oraz brak wykazu zastosowanych (na szczęście nielicznych) skrótów. Chciałbym też zauważyć, zaznaczając, iż jest to opinia subiektywna, że rozdzielenie opisu zastosowanych metod badawczych; podanie informacji ogólnych - *stricte* teoretycznych i części informacji szczegółowych jako początkowych podrozdziałów rozdziału 8 (str. 85-99) i ulokowanie pozostałych, nie mniej istotnych informacji metodycznych w rozdziale jedenastym (str. 189-195) - ostatniej części tej relacji, utrudnia śledzenie omawianych wyników, wymaga bowiem nieustannego wertowania pracy. Uważam, że w przypadku niniejszej pracy, w której zastosowano wiele różnych procedur badawczych, w tym procedur analitycznych, kompletny i szczegółowy opis metod poprzedzający omówienie wyników, byłby znacznie lepszym rozwiązaniem.

Na opis merytoryczny zagadnień przedstawionych w zwartej formie jako założenia i cel pracy, składają się: omówienie podstawowych cech polifenoli, w tym aktywności prozdrowotnej tych substancji, krótka informacja poświęcona roli jonów metali w organizmach zwierząt, a w szczególności ludzi, szereg zagadnień poświęconych tworzeniu kompleksów jonów metali, zbiór informacji o roślinach stosowanych w terapii kamicy nerkowej oraz o substancjach aktywnych wyodrębnionych z tych roślin. Tę część pracy kończy kompendium poświęcone etiologii oraz sposobom leczenia kamicy nerkowej. Wśród wielu różnorodnych informacji literaturowych, szczególnie interesująco przedstawione zostały zagadnienia dotyczące połączeń chemicznych polifenoli i ich pochodnych, z jonami metali.

Opisując powstawanie kompleksów jonów metali z polifenolami (5.4.3) Autorka wspomina również o podjednostkach cukrowych wchodzących w skład struktur ligandów, po czym koncentruje się jedynie tworzeniu połączeń z grupami funkcyjnymi flawonoidów. Z lektury poprzedniego podrozdziału (5.4.2) wynika, że „alkohole cukrowe” także tworzą kompleksy z jonami wapnia. Czy zatem znane są przykłady tworzenia połączeń równocześnie, przez podjednostki cukrowe i podjednostki polifenolowe tej samej molekule glikozydu polifenolowego z jonami metali? Komentarz w tej materii byłby interesującym uzupełnieniem odpowiednich wątków dysertacji.

Wspomniana wcześniej obszerność pracy, wynikająca z mnogości wątków, niewątpliwie wpłynęła na pojawienia się nieścisłości edytorskich. Ponieważ nie spotkałem się do tej pory z dysertacją pozbawioną tego typu błędów, z obowiązku recenzenta zwracam uwagę jedynie na niektóre, występujące w części teoretycznej.

str.9 Czy można izolować preparat, jak sugeruje Autorka formułując cele swoich badań ?

str.11 We wzorze przykładowej struktury tanin brakuje podwójnego wiązania w pierścieniu aromatycznym, a sam podpis sugeruje tożsamość pojęć „taniny” oraz „galotanina” co nie jest prawdą.

str. 12 Brakuje wyjaśnienia jaki charakter chemiczny posiadają podstawniki R<sup>1</sup>- R<sup>6</sup> we wzorze przykładowej struktury „antocyjanin”. W przypadku rozróżniania związków polifenolowych to istotna kwestia.

str.13 Z treści nie wynika, czy w akapicie poświęconym działaniu przeciwzapalnemu polifenoli, stwierdzenie: „...pomagają w redukcji azotanów i azotynów...” dotyczy procesu chemicznego – redukcji, czy obniżenia stężenia tych związków.

str. 14 Autorka podaje informację: „Metale stanowią główne miejsce katalityczne enzymu ...”, z którą trudno się zgodzić, gdyż nie wszystkie enzymy zawierają jony metali.

str. 28 Zapewne przez pomyłkę jeden z węgli sześciowęglowego pierścienia B (Rys. 11) ma numer „7’ ”.

str. 29 Opisując cechy widma <sup>13</sup>C NMR primuletyny warto zachować precyzję w określeniu cech sygnałów węgli określonych pierścieni – w tym przypadku zmieniają się wartości przesunięć odpowiednich węgli pierścieni A i C, a nie A i B jak sugeruje Autorka.

Na tej samej stronie wyjaśnienia wymaga Rys. 12, gdyż powstający kompleks prezentowany na tym rysunku nie jest pochodną 5-hydroksyflawonu, a 3-hydroksyflawonu, wobec tego nie jest wynikiem odpowiedniej reakcji primuletyny.

str. 35 Wbrew podanej przez Autorkę informacji, kwercytyna nie jest substancją nadającą „barwę roślinom”.

str. 37 Z pewnością mylnie podano wartość długości fali jednego z pasm charakteryzujących drgania pierścienia B kompleksu kwercytyny z jonami miedzi, określając ją jako 13658 cm<sup>-1</sup>.

str. 55, 56, 64, 65 – Czy istnieje szczególny powód prezentacji wiązania pomiędzy pierścieniami B i C kilku przedstawionych struktur, jako wiązania leżącego poza płaszczyzną wyznaczoną przez układ hybrydyzacyjny sp<sup>2</sup> węgli 2 i 3 pierścienia C?

str. 63 Podana nazwa „1,4-bis(3,4-dihydroksyfenyl)-2,3-dimetylobutan” nie odpowiada strukturze opisywanej substancji.

Oczywiście, wskazane nieścisłości nie wpływają istotnie na ogólnie pozytywną percepcję literaturowej części dysertacji, która płynnie przechodzi w omówienie zakresu badań, ze wskazaniem osób i jednostek współpracujących z Autorką w niniejszym projekcie. Prezentację wyników doświadczeń poprzedza opis podstaw teoretycznych stosowanych metod badawczych, który równie dobrze mógłby być ulokowany w części literaturowej.

Zasadniczym etapem badań Pani mgr inż. Ewy Klepacz było pozyskanie ekstraktów, z określonych części wytypowanych roślin o znanych właściwościach leczniczych. Zapewne z tego powodu Autorka wyróżniła aż osiem procedur ekstrakcji (Metody I – VIII), chociaż nie

wszystkie metody obejmują w pełni odrębne procesy. Na przykład trudno wyraźnie rozróżnić wariant ekstrakcji metanolem Metody I od Metody V opisaną w pracy. Finalnie, stosując różne rozpuszczalniki oraz modyfikując procedury ekstrakcji, Autorka uzyskała bez mała dwadzieścia jeden (21) ekstraktów każdej z testowanych matryc roślinnych. To imponująca kolekcja frakcji, tym bardziej brakuje nawet obrazowego zestawienia ich składu chemicznego które można by uzyskać stosując chromatografię planarną np. TLC. Zgodnie z przyjętymi założeniami Doktorantka oznaczyła w każdym z ekstraktów całkowitą zawartość substancji o charakterze polifenoli oraz zawartość substancji o charakterze flawonoidów, nie podając niestety ani granicy wykrywalności, ani granicy oznaczalności stosowanych procedur. Być może z tego powodu w tabelach nr 32 i 33 pojawiły się wartości 0,0005 mg/g, które trudno uznać za wiarygodne bazując na podanej procedurze oznaczeń. Nie zostało również jednoznacznie określone, czy podane wartości odzwierciedlają zawartość średnią – w tym przypadku brakuje informacji o wartościach błędów ( $\pm$ SE) lub odchyłek ( $\pm$ SD) standardowych, czy też są to wartości ustalone jednorazowo – w tym przypadku należy je traktować z odpowiednią ostrożnością. Tym bardziej, że tę cechę ekstraktów – zawartość polifenoli oraz flawonoidów w pozyskanych frakcjach, Autorka stara się korelować z właściwościami terapeutycznymi testowanych ekstraktów, przyznając, że było to trudne zadanie. Za interesujące w kontekście potencjalnego oddziaływania na złoże wapniowe, uważam sprawdzenie zdolności składników ekstraktów do wiązania jonów wapnia  $Ca^{2+}$  i zastosowanie do tego celu miareczkowania konduktometrycznego. Ta część doświadczeń dostarczyła naprawdę interesujących danych, chociaż zastanawiam się dlaczego Autorka ustalając wartości PK posłużyła się dopasowaniem prostoliniowym, które, co widoczne jest na Rys. 32 (wykres „krzywa związku”), nie gwarantuje dokładnego wyznaczenia poszukiwanej wartości. Wskazanie minimalnych wartości przewodnictwa z dokładnością do 10  $\mu$ l, byłyby moim zdaniem wystarczające do ustalenia rankingu i z pewnością bliższe wartościom pomiarowym.

Przychyłam się opinii Doktorantki, w myśl której zdolność komponentów ekstraktów (preparatów) do tworzenia połączeń z jonami wapnia, zestawiona z danymi dotyczącymi zdolności tych frakcji do rozpuszczania kamieni nerkowych w doświadczeniach *in vitro* oraz z danymi z badań *in vivo*, mogą być ważnym wyznacznikiem przydatności terapeutycznej tych substancji. Dlatego tak istotna w tych dociekaniach jest klarowność i powtarzalność stosowanych procedur oraz precyzja oznaczeń. Tymczasem nie w każdym przypadku, opis zastosowanej procedury jest na tyle ścisły, że umożliwia odtworzenie przeprowadzonych doświadczeń. Być może wynika to z zastrzeżeń jednostek współpracujących z Doktorantką. W takim przypadku należy o tym wspomnieć. Odnosząc się do zawartych w tej pracy opisów stosowanych procedur, chciałbym poprosić Autorkę o komentarz odnośnie wyników oznaczeń  $\Delta Ca^{2+}$  próbek O14, O15 i O16 w tabeli nr 15, str. 118, spośród których szczególnie

istotna jest wartość  $\Delta\text{Ca}^{2+}$  próbki O15, dzięki której ten ekstrakt z ostropestu został uznany za najbardziej obiecujący. Opierając się na przyjętym i opisanym przez Doktorantkę sposobie obliczania wartości  $\Delta\text{Ca}^{2+}$ , wspomniane wyniki należy uznać za niepoprawne. Proszę również o doprecyzowanie opisu procedury oznaczeń zawartości jonów wapnia przynajmniej na tyle, by uwiarygodnić wyniki wskazujące na wyższą zawartość jonów wapnia, niż wprowadzona do układu pomiarowego. Warto wyjaśnić powstałe w tej kwestii nieścisłości, bowiem na podstawie tych danych Autorka wartościuje potencjalną przydatność pozyskanych ekstraktów w terapii medycznej. W kontekście poprawności obliczeń i ich wyników, korzystne byłoby także ujednoczenie liczby cyfr znaczących wartości zestawianych w tabelach.

Ciekawym pomysłem zastosowanym przez Panią mgr inż. Ewę Klepacz do oceny zdolności ekstraktów do rozpuszczania szczawianu wapnia, była analiza mikroskopowa – mikrometryczny pomiar zmian najdłuższych średnic kryształów tej soli, potraktowanych pozyskanymi ekstraktami. Dokładność podanych wyników pomiarów – 0,1  $\mu\text{m}$ , wskazuje, że prowadzono je pod powiększeniem zdecydowanie większym, niż 4-krotne podane przez Autorkę na str. 122, większym nawet niż powiększenie 10-krotne, podane dla tej samej procedury na str. 194. Mimo, że brakuje dokładnych informacji metodologicznych, załączone mikrofotografie jednoznacznie dowodzą skutecznego działania niektórych preparatów. Jak jednak zauważa także Autorka, wyniki rozpuszczalności uzyskane w toku analizy mikroskopowej odbiegają od wyników oznaczeń zawartości jonów wapnia. Dyskutując tę kwestię warto uwzględnić, że porównywane dane pochodzą z dwóch odrębnie przeprowadzonych i odmiennych proceduralnie eksperymentów. Być może oznaczenie zawartości jonów wapnia w tych samych próbkach, które poddano analizie mikroskopowej dostarczyłoby bardziej adekwatnych informacji. Dobrym pomysłem i dzięki temu ciekawym elementem przeprowadzonych badań było określenie kinetyki rozpuszczania stałego szczawianu wapnia. Dzięki zastosowaniu autorskiego rozwiązania technicznego – „stanowiska pomiarowego do badania kinetyki rozpuszczalności szczawianu wapnia”, Doktorantka wykazała różne właściwości poszczególnych ekstraktów w tym względzie.

Zgodnie z koncepcją pracy, pozyskane frakcje wykazujące pożądane cechy tj. hamujące powstawanie trudno rozpuszczalnych w wodzie kompleksów jonów wapnia, a równocześnie rozpuszczające istniejące krystaliny szczawianu wapnia, zostały poddane testom biologicznym. Wyniki (odpowiednie wartości  $\text{IC}_{50}$ ) przeprowadzonych w pierwszej kolejności testów cytotoksyczności wobec linii komórkowej wyprowadzonej z embrionalnych komórek ludzkich nerek, skutecznie wyeliminowały frakcje cytotoksyczne z dalszych badań. W tej sytuacji niezrozumiałe, z punktu widzenia konsekwencji prowadzonych doświadczeń, jest wykorzystanie frakcji – ekstraktu metanolowego z owoców żurawiny wielkoowocowej (Ż2) w badaniach laboratoryjnych na zwierzętach. Cytotoksyczność tego ekstraktu nie była

bowiem weryfikowana, albo też nie została omówiona w odpowiedniej części dysertacji. W toku ustalenia pożądanej aktywności ekstraktu w warunkach *in vivo*, najpierw badano ilościowy efekt transportu polifenolowych składników frakcji do moczu testowanych zwierząt, a następnie wpływ podanych frakcji na celowo utworzone - wyindukowane trzema metodami, złogi nerkowe szczurów. Akceptując logikę tego toku badań, trudno zaakceptować przedstawione wyniki oznaczeń: związków o charakterze polifenoli, flawonoidów oraz jonów wapnia, w moczu, w odpowiednim dniu po podaniu preparatu. Podane wartości średnich stężeń związków o charakterze polifenoli i flawonoidów (odpowiednio Rys. 57 i 58); od kilkuset do ponad tysiąca mg tych substancji w jednym mililitrze (mg/ml), z pewnością nie są poprawne. Najbardziej prawdopodobnym jest mylne wpisanie jednostki, chodziło zapewne o mg/l. W obecnej wersji oznaczone stężenia związków o charakterze polifenoli oraz flawonoidów są wyższe, niż wprowadzone do układu doświadczalnego z ekstraktem Ż2. Ponadto, sama informacja o tym, że wykresy odzwierciedlają średnie stężenia, bez określenia przedziału ufności, nie uwiarygadnia tych danych. Z tego samego powodu trudno również odnieść się do oznaczeń zmian zawartości jonów wapnia  $Ca^{2+}$  w moczu, gdyż brak określenia przedziału ufności, a co za tym idzie istotności prezentowanych zmian, pozwala na stwierdzenie co najwyżej pewnej tendencji. Na pożądane działanie testowanej frakcji wskazują wyniki badań USG, zamieszczone w kolejnym podrozdziale, które dowodzą zmniejszania się rozmiarów i rozproszenia wyindukowanych złogów, po doustnym podaniu ekstraktu metanolowego z owoców żurawiny. Ten sam pozytywny efekt sugerują wyniki oznaczeń, które wskazują na wzrost wydalania jonów wapnia po podaniu ekstraktu.

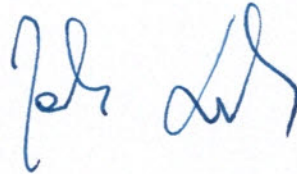
Zestaw danych eksperymentalnych uzyskanych przez Doktorantkę i współpracujące z Nią zespoły jest cennym zbiorem informacji, w których interpretacji pomocne mogłoby być zastosowanie metod statystycznych. Szczególnie, że sama Autorka wielokrotnie pisze o poszukiwaniu korelacji pomiędzy grupami odpowiednich informacji. W opinii Recenzenta, rezygnując z zastosowania nawet podstawowych metod wielowymiarowej analizy danych, Autorka nie wykorzystwała w pełni możliwości interpretacji interesujących wyników tego wielowątkowego projektu badawczego. Mam jednak nadzieję, że publikując warte tego wyniki prezentowanych dociekań, Pani mgr inż. Ewa Klepacz skorzysta z możliwości rozszerzonej analizy danych.

Koncentrując się na walorach ocenianej rozprawy, chciałbym stwierdzić, że niezależnie od sformułowanych wyżej uwag, które wynikają z pełnionej przeze mnie roli recenzenta, opracowanie to dostarcza wartościowych naukowo przesłanek na rzecz zastosowania naturalnych preparatów zawierających ekstrakty z odpowiednich części roślin, jako środków wspomagających terapię kamicy nerkowej.

Podsumowując ocenę dysertacji doktorskiej Pani mgr inż. Ewy Klepacz, mogę stwierdzić, iż praca ta zawiera oryginalny opis dociekań Autorki, poświęconych

zagadnieniom naukowym o znaczącym potencjale aplikacyjnym i w moim przekonaniu spełnia warunki ujęte w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 2003 r. z późniejszymi zmianami.

Wnoszę zatem o dopuszczenie, przez Wysoką Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, Pani mgr. inż. Ewy Klepacz do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

A handwritten signature in blue ink, consisting of two distinct parts. The first part is a stylized, cursive 'E' followed by a few loops. The second part is a more complex, cursive flourish that ends in a sharp hook.