



UNIVERSITAS  
OPOLIENSIS

Katedra Chemii Analitycznej i Ekologicznej  
WYDZIAŁ CHEMII, UNIWERSYTET OPOLSKI

ul. Oleska 48, 45-052 Opole, Poland

tel. +48 077-4527115

kchaie@uni.opole.pl, www.kchaie.uni.opole.pl

Opole 06 czerwca 2020

Prof. dr hab. Jacek Lipok

#### OCENA

Pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Czeszak

p.t.: „Wybrane alkaloidy izochinolinowe – charakterystyka i potencjalne zastosowanie farmakologiczne”

przygotowanej w Zakładzie Chemii Stosowanej Wydziału Chemii

Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu,

pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Izabeli Nowak,

przy udziale promotora pomocniczej Pani dr Matyldy Resztak

Poszukiwanie substancji aktywnych leków wśród metabolitów roślin przeżywa aktualnie swoisty, w pełni uzasadniony renesans. Najważniejszymi przesłankami tych działań są: wielowiekowa tradycja stosowania ziół w leczeniu - dzięki czemu badacze dysponują bogatą bibliografią dotyczącą studium przypadków, możliwości techniczne pozwalające na pozyskiwanie i oznaczanie zarówno aktywnych farmakologicznie frakcji i odrębnych substancji oraz brak obaw o nadmierne obciążenie środowiska pozostałościami leków, ze względu na ich naturalny charakter. Istotne znaczenie ma również możliwość wykorzystania struktury każdego z pozyskanych leków naturalnych jako swoistego wzorca, którego modyfikacje prowadzą do zmiany spektrum oraz skuteczności działania w określonych przypadkach. Połączenie poszukiwań naturalnych leków – kojarzone z farmakognozą, z badaniem transferu substancji aktywnych zawartych w nowych formach użytkowych, które bliższe jest farmakokinytyce, stanowią kanwę pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Czeszak. Zdając sobie sprawę ze złożoności i wymagań czasowych pełnego toku badań, Autorka skoncentrowała się na kluczowych zagadnieniach: (i) wyodrębnieniu, oznaczaniu i częściowej charakterystyce alkaloidów izochinolinowych zawartych w liściach i łodydze glistnika jaskółcze ziele (*Chelidonium majus* L.), (ii) syntezie i charakterystyce chemicznej nanonośników leków – stałych nanocząstek lipidowych (SLN), (iii) tworzeniu formy użytkowej w postaci nanocząstek lipidowych, do których inkorporowano testowane alkaloidy, (iv) badaniu dynamiki uwalniania alkaloidów z nanonośnika oraz (v) ocenie aktywności cytostatycznej wytworzonych nanostruktur.

Konsekwentny i logicznie usystematyzowany zestaw pracochłonnych zadań badawczych, których realizacja wymagała rzeczywistej znajomości zagadnień chemii produktów naturalnych, chemii analitycznej, elementów syntezy i technologii chemicznej, a także elementów farmakokinytyki, dowodzi przemyślanego toku badań,

stanowiącego prawdziwe wyzwanie dla początkującego badacza. Z tym większym uznaniem należy stwierdzić, że Pani Aleksandra temu wyzwaniu podołała. Dowodem jest treść przedłożonej mi do oceny dysertacji doktorskiej, w której liczne wątki badań i bogaty zestaw wyników zostały zaprezentowane w klasycznej formie, na którą składają się: omówienie obszaru badań ze wskazaniem kluczowych zagadnień stanowiących cel rozprawy, metodologia, relacja toku i wyników badań oraz dyskusja uzyskanych rezultatów. Klasyczną kompozycję dysertacji dobrze oddaje sekwencja stosownie wyodrębnionych części; począwszy od spisu treści i wykazu stosowanych skrótów, przez syntetyczny wstęp, część literaturową, metodologię, omówienie wyników, po rozdział „Podsumowanie i wnioski”, który zawiera rekapitulację wybranych przez Autorkę wątków dysertacji. Końcową część opracowania stanowią: streszczenia w języku polskim i angielskim, zestawienie dorobku naukowego Autorki oraz wykaz cytowanej literatury. Wszystkie zawarte w rozprawie informacje, w tym 29 tabel i 37 rysunków, ujęto na 152 numerowanych stronach. Odpowiednie proporcje zawartości poszczególnych partii merytorycznych; części literaturowej, prezentacji stosowanych metod i procedur badawczych oraz omówienia wyników, potwierdzają w pełni, iż rozprawa Pani mgr Aleksandry Czeszak oparta jest na toku badań eksperymentalnych.

Oceniając niniejszą dysertację od strony formalnej, chciałbym zauważyć, że praca napisana jest z widoczną dbałością o formę oraz precyzję i poprawność języka. Liczba „literówek” i drobnych potknięć językowych jest naprawdę niewielka. Natomiast nieco bardziej istotne wydają się być kwestie poruszone niżej:

1. Poprawna nazwa binominalna glistnika jaskółcze ziele w języku łacińskim to *Chelidonium majus* L.. Nazwa rodzajowa „*Chelidonium*” rozpoczyna się od dużej litery, natomiast nazwa gatunkowa „*majus*” z małej. W tekście widoczne są odstępstwa od tej reguły;
2. W opisie procesu biosyntezy powinno uwzględniać się enzymy, jako odpowiednie biokatalizatory sekwencji omawianych przemian. Nazwy enzymów, albo odpowiednie ich kody wywodzące się z międzynarodowego systemu klasyfikacji enzymów, powinny być umieszczane „na strzałkach” wskazujących kierunek przebiegu określonych biotransformacji. W niniejszej pracy powinny być uwzględnione rysunkach 7 i 8 oraz w opisie procesu;
3. Zbyt lakoniczne tytuły podrozdziałów w części metodologicznej pracy – często w formie równoważników zdań np. „Stabilność”, „Liniiowość” etc., nie ułatwiają śledzenia poszczególnych wątków omawianych procedur odnoszących się do różnych eksperymentów.
4. Str. 51, podrozdział 5.3 - zgodnie z szerzej akceptowaną konwencją zapisu wzorów sumarycznych soli kwasów organicznych, wzór mrówczanu amonu powinien rozpoczynać się od części organicznej – zatem bardziej poprawną formą jest  $\text{HCOONH}_4$ ;
5. Str. 80, Rys. 21 – porównywany jest raczej wpływ dwóch technik wspomagających ekstrakcję, a nie „alternatywne metody”. Analiza różnic pomiędzy danymi prezentowanymi na wykresie jest jednak utrudniona, ze względu na brak odniesień do wartości przedziałów ufności oznaczeń, umieszczonych np. w formie „słupków błędów” towarzyszących podanym wartościom średnim. Brak graficznych odpowiedników przedziałów ufności wartości średnich prezentowanych na wykresach słupkowych, jest uwaga ogólną dotyczącą rysunków 19, 20, 21, 23;

6. Opisując zastosowanie chromatografii jako metody rozdzielania analitów, zalecane jest używanie właśnie tej formy: „rozdzielanie”, jako poprawnej. Tymczasem w tekście pojawia się wielokrotnie termin „rozdział analitów/związków” odmieniany przez przypadki gramatyczne.

Kontynuując wątek dotyczący zawartości merytorycznej poszczególnych, wyodrębnionych części ocenianej pracy warto zwrócić uwagę na konsekwentne wprowadzanie czytelnika w problematykę podjętych badań poprzez: wskazanie glistnika jaskółcze ziele (*Chelidonium majus* L.), jako naturalnego źródła testowanych alkaloidów, omówienie podstawowych cech tych substancji z uwzględnieniem biosyntezy i właściwości terapeutycznych, metod wyodrębniania i badania cech fizykochemicznych. Równie sprawnie Autorka podaje informacje poświęcone tworzeniu i badaniom właściwości fizykochemicznych oraz cech użytkowych stałych nanocząstek lipidowych, jako nośników substancji bioaktywnych. Prezentację problematyki badań kończy opis metod oceny aktywności biologicznej alkaloidów inkorporowanych do lipidowych nanostruktur. Kolejne rozdziały rozprawy w spójny sposób dokumentują tok przeprowadzonych badań eksperymentalnych, anonsowanych ogólnie sformułowanym celem, precyzyjniej zdefiniowanym dzięki charakterystyce poszczególnych etapów badań przeprowadzonych przez Doktorantkę. Mimo uważnej lektury „celu” w powiązaniu z analizą wyników stosownych doświadczeń, nie zdołałem zidentyfikować źródła daleko idącej ostrożności Autorki, która pisze: „...podjęto próbę opracowania metody syntezy stałych cząstek lipidowych inkorporowanych badanymi alkaloidami.” Zespół Pani Prof. Izabeli Nowak, w którym Pani Aleksandra realizowała swoją pracę szczyci się znakomitymi osiągnięciami w syntezie SLN i w efektywnym wzbogacaniu składu tych struktur różnymi substancjami pochodzenia naturalnego. W moim przekonaniu kwestią było zatem nie: „czy się uda”, a „jak efektywnie uda się inkorporować alkaloidy do SLN”. Przekonanie to poparte jest wieloma bardzo klarownymi, szczegółowymi informacjami podanymi w części metodologicznej i odnoszącymi się bezpośrednio do syntezy stałych nanocząstek lipidowych, wzbogacenia tych struktur o inkorporowane alkaloidy oraz dobrze zweryfikowanymi wynikami tych działań. Zawartość merytoryczna wspomnianego rozdziału poświęconego metodyce pracy, wskazuje również na bardzo poważny udział zagadnień analitycznych w toku planowanych badań, co bardzo dobrze odzwierciedla zakres głównych założeń badawczych. Co najmniej w czterech, spośród sześciu eksponowanych zakresów prac eksperymentalnych, analityka odgrywa jednoznacznie kluczową rolę, gdyż wyniki odpowiednich pomiarów dostarczają danych umożliwiających wielowymiarową charakterystykę testowanych układów. Tezę tę potwierdza także godny pochwały, liczny zbiór zadań, które umożliwiły walidację zastosowanych procedur analitycznych, co jest rzadko spotykane w pracach obejmujących tak szerokie spektrum zagadnień badawczych.

Precyzję prezentacji zagadnień metodologicznych, do której Doktorantka przyzwyczajają czytelnika, wręcz podkreślają drobne nieścisłości w rodzaju stwierdzenia na str. 53, podrozdział 7.7.3: „Po pobraniu 1 ml górnej warstwy organicznej ...”, gdzie w przypadku zastosowania dichlorometanu jako ekstrahenta jest mało prawdopodobne by, ze względu na gęstość ( $1330 \text{ kg/m}^3$ ), warstwa tego rozpuszczalnika była „warstwą górną” wobec wodno-metanolowego roztworu ekstrahowanego. Z kolei w rozdziale 7, tytuł podrozdziału 7.4 (str. 63), w którym opisano warunki procesu rozdzielania analitów techniką HPTLC, podano jako „warunki analizy”, a w

samej procedurze nie podano objętości nanoszonych roztworów, bądź też ilości nanoszonej substancji. Intrygujące w kontekście prowadzonych badań były kryteria doboru „wzorca wewnętrznego”, wyjaśnione częściowo dopiero w podrozdziale 11.1. Niepoprawny, zdaniem recenzenta, jest także tytuł podrozdziału 8.1.1 „Analiza statystyczna” sugerujący, że optymalizacja syntezy SLN, przygotowana zgodnie z regułami *Experimental Factor Design*, jest procedurą oceny danych pomiarowych z wykorzystaniem metod statystycznych. W rzeczywistości jest to przygotowanie doświadczenia w sposób, który umożliwi poprawne stworzenie zbiorów wartości zmiennych niezależnych i zmiennych zależnych, przetwarzanych następnie metodami statystycznymi, w celu ustalenia ewentualnych zależności łączących elementy tych zbiorów. Na szczęście zarówno samo doświadczenie, jak i ocena statystyczna wyników tego przedsięwzięcia zostały przeprowadzone w pełni poprawnie i dobrze zinterpretowane, co znalazło wyraz w omówieniu, a później w podsumowaniu tej części badań.

Lektura rozdziału poświęconego metodologii oraz kolejnego, poświęconego omówieniu uzyskanych wyników dowodzą, że Pani mgr Aleksandra Czeszak znalazła skuteczny sposób, by liczne wątki prowadzonych przez Nią badań tworzyły spójny tok działań. Począwszy od scharakteryzowania wybranych właściwości testowanych alkaloidów, poprzez wyodrębnienie tych substancji z tkanek roślinnych oraz określenie ich zawartości w sposób, którego poprawności i czułości dowiodła walidując stosowane procedury analityczne. Następnie Autorka udowodniła, że testowane substancje można oznaczyć w osoczu z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV), na poziomie mikrogramów na mililitr ( $\mu\text{g/ml}$ ). Wykazała też, że zastosowanie techniki LC-MS/MS sprawia, iż alkaloidy obecne w osoczu oznaczane są w stężeniach nanogramowych na mililitr ( $\text{ng/ml}$ ). Walidując wykorzystane procedury analityczne Doktorantka dowiodła pełnej wiarygodności swoich pomiarów, a precyzyjny opis tych działań sprawia, że oznaczenia te mogą być powtarzane w dowolnym, odpowiednio wyposażonym laboratorium. Uważam, że jest to osiągnięcie godne podkreślenia, gdyż przygotowanie próbek analitycznych złożonych matryc – do takich zalicza się osocze, oznaczenie analitów dwiema metodami i walidacja tych procedur są poważnym wyzwaniem badawczym, nie tylko dla osób znajdujących się u progu kariery naukowej. Kompetencji laboratoryjnych Autorki dowodzą także eksperymenty dedykowane syntezie stałych nanocząstek lipidowych, inkorporowaniu testowanych alkaloidów do tych struktur, a następnie ustaleniu wielu istotnych właściwości tak wytworzonych układów. Bardzo istotnym elementem badań okazały się doświadczenia poświęcone dynamice uwalniania alkaloidów z nanostruktur lipidowych. Swoistym ukoronowaniem części eksperymentalnej było ustalenie aktywności cytostatycznej tych związków testowanych w formie niezwiązanej oraz w formie enkapsulowanej w SLN. Stosowne testy wobec wybranych linii komórek nowotworowych przeprowadzono we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Poznaniu. W opinii recenzenta, najbardziej interesującym rezultatem tego etapu badań jest ustalenie, że efektywnie enkapsulowana w SLN sangwinaryna (ok. 80% wydajności), uwalnia się relatywnie wolno, a równocześnie ten sam system SLN-SA najskuteczniej hamuje proliferację komórek testowanych linii nowotworowych. Wynik ten może się stać ważnym przyczynkiem do kontynuowania badań możliwości terapeutycznego wykorzystania tego zjawiska i systemu SLN-SA.

Uważna lektura omówienia wyników sprawiła, że niektóre poruszone kwestie pozostawiły pewien niedosyt, byłbym zatem zobowiązany, gdyby Autorka zechciała odnieść się do sformułowanych niżej zagadnień:

1. Czemu służyła optymalizacja metod ekstrakcji alkaloidów z liści i łodyg *Ch. majus* L., skoro we wszystkich kolejnych eksperymentach wykorzystywano, a przynajmniej na to wskazuje opis tych zdarzeń, alkaloidy dostępne handlowo?
2. Czy podjęto próby stworzenia SLN, do których inkorporowano mieszaninę alkaloidów w relacji ilościowej tych substancji, odpowiadającej ich zawartości w roślinach glistnika?
3. Co było powodem poszukiwania korelacji pomiędzy wartościami logP testowanych alkaloidów, obliczonymi z wykorzystaniem algorytmów teoretycznych, a wartościami eksperymentalnymi logP ?; Czy w obliczeniach zastosowano także atrybuty środowiska kwaśnego (pH=3) ?; Czy mógłbym również prosić o zinterpretowanie wyników przedstawionych na Rys. 29 (str. 96).

Podsumowując niniejszą ocenę pragnę jednoznacznie stwierdzić, że sformułowane uwagi oraz prośby o wyjaśnienie niektórych kwestii, nie wpływają na moją bardzo pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Czeszak, a są jedynie zaproszeniem do pogłębionej dyskusji tych zagadnień.

Dlatego też, doceniając walory projektu naukowego, którego relacją jest oceniana rozprawa, a imponującego szerokim spektrum spójnych logicznie zadań badawczych stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja doktorska Pani mgr Aleksandry Czeszak zawiera oryginalne, wartościowe naukowo informacje, a równocześnie posiada wydzźwięk aplikacyjny. W moim przekonaniu, niniejsza rozprawa spełnia warunki ujęte w art. 13 pkt.1 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789), jak również stosowne zapisy ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2018r. poz. 1668).

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Chemia, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Czeszak, do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Ponadto, biorąc pod uwagę wartość naukową i potencjał aplikacyjny wyników badań ujętych w niniejszej dysertacji, proponuję Wysokiej Radzie wyróżnienie tej rozprawy, w sposób zwyczajowo przez Radę przyjęty.

