

Prof. dr hab. Andrzej Niewiadomy

Lublin, 24-07-2018 r.

Katedra Chemii UP w Lublinie

Ocena rozprawy doktorskiej

pt.: Właściwości przeciwgrzybicze wybranych ekstraktów roślinnych, w tym pozostałości roślinnej stanowiącej rolniczy materiał odpadowy, a skład chemiczny ekstraktów” wykonanej przez Panią magister Sylwię Garbaczewską

Działalność powiązana z pozyskiwaniem ze świata roślin substancji o działaniu biologicznym jest cały czas jednym z alternatywnych, w stosunku do syntezy organicznej, kierunków poszukiwania związków aktywnych. Niekiedy też wskazuje układy wiodące do syntezy jakkolwiek obecnie ze względu na wieloletnią eksplorację zasobów naturalnych i obiektywne trudności analityczne udziału takich badań i szans na powodzenie jest statystycznie niewielki podobnie jak możliwość bezpośredniego zastosowania wyselekcjonowanych związków.

Wyodrębnienie nowych związków z natury jest więc utrudnione, tym bardziej, że w przypadku roślin, należy uwzględniać prawdopodobieństwo występowania około 250 tys. różnych metabolitów. Świat roślin jest przy tym rezerwuarem zarówno związków dobroczynnych jak i zagrażających. Zdarza się często też tak, że nakład pracy i potwierdzenie obecności związków w izolacie nie musi prowadzić do zamierzonego powodzenia, gdyż mogą one występować w nikłym udziale ilościowym i trudno określić ich działanie. Jednak tego rodzaju badania, a więc między innymi takie jak przedstawione w przedłożonej pracy doktorskiej, mają zawsze uzasadnienie, gdyż aktywne substancje występujące w przyrodzie, w wielu przypadkach mogą być układem wyjściowym i wskazywać drogę do racjonalnego projektowania odpowiednich analogów. Są one również celowe z uwagi na możliwość wyszukania w danej grupie związków relacji budowa-aktywność. Trudne jednakże ze względu na konieczność uprzedniego rozważenia właściwości chemicznych przewidywanych do wyosobnienia związków i zaplanowania możliwości ich identyfikacji. Należy przy tym zwrócić uwagę, że w zależności od cech gatunkowych rośliny, usiłują bronić się przed zagrożeniami życiowymi (m.in. inwazją różnego rodzaju drobnoustrojów chorobotwórczych) i wytwarzają

odpowiednio czynne związki, których obecność chciała Autorka pracy potwierdzić i wykorzystać w kierunkowych badaniach biologicznych.

W mojej opinii taki zamysł, aby z natury izolować związki o określonym działaniu biologicznym jest bardzo cenny i niezależnie od powodzenia praktycznego, może wskazywać dalsze kierunki badawcze dla zespołów zajmujących się projektowaniem i syntezą pestycydów.

Zasadność podjętych w pracy badań wiąże się również z tym, że z rejestru pestycydów dopuszczonych do stosowania, usunięto nie tylko większość preparatów zagrażających bezpieczeństwu zdrowotnemu ludności, ale też wiele kombinacji funkcjonalizowanych substancjami z natury wobec niejednoznaczności mechanizmu ich działania czy skutków odległych zastosowania w środowisku.

Cele pracy zostały właściwie zaplanowane i były realizowane kolejno, w miarę uzyskiwania wyników odpowiednich badań. Zastosowano różnorodne warunki ekstrakcji i techniki chromatograficzne oraz metody identyfikacji związków składowych. Przedstawione przeze mnie ogólne ujęcie zagadnień związanych z analityką chemiczną, wymaga uzupełnienia i zwrócenia uwagi na przygotowanie merytoryczne Doktorantki, szczególnie wykorzystanie metod spektrofotometrycznych. Do analizy złożonych mieszanin pochodzenia roślinnego stosowano techniki GC-MS i LC-MS (spektrometry z kwadrupulowym filtrem masowym). To szczególnie wymagające zadanie, biorąc pod uwagę możliwość rejestracji w widmach jonów wtórnych czy analizę fragmentacji jonu molekularnego. Zastosowano różne techniki jonizacji, w tym ESI w trybie ujemnym i dodatnim, a także monitorowanie jonów SIM. W związku z tym mam pytanie, czy nie rozważano (nie było możliwości) analizowania mieszanin bez wcześniejszego rozdzielania jej składników przy wykorzystaniu spektrometru tandemowego?

Zwracając uwagę na niedyskusyjne osiągnięcia w zakresie chemii analitycznej, w mojej opinii, chciałbym wskazać również na wartości zbiologizowanej części pracy poświęcone zarówno problematyce badań mikrobiologicznych jak i toksykologicznych. Obejmują one ocenę zdolności hamowania przez izolaty (również główne ich składniki) rozwoju kolonii grzybów fitopatogenicznych w teście szalkowym oraz oddziaływania w stosunku do organizmów chronionych. W stosunku do większości kultur grzybów fitopatogenicznych i *A. apis* dobre zdolności biostatyczne wykazywały ekstrakty z łupin orzecha włoskiego oraz ekstrakty z łupin cebuli. Selektywnie czynne były też składniki ekstraktów jaskółczego ziela w stosunku do *B.*

cinerea. W tym przypadku należałoby prowadzić dalsze prace badawcze w celu pełniejszej analizy składu izolatów i działania poszczególnych związków. Odnosząc się do wyników, jakie uzyskano przy zastosowaniu ekstraktów w stosunku do *A. apis*, zwracają uwagę niewielkie różnice ich czynności przy funkcjonalizacji stężeń związków wyodrębnionych. Porównując wyniki aktywności grzybostatycznej izolatów Doktorantka zwraca zarówno uwagę na zmienność materiału (surowca roślinnego) jak i możliwość uwarunkowań wynikających z odmianowości, czynników klimatycznych, a uwzględniać należy jeszcze wpływ czynników uprawowych kształtujących, w znacznym stopniu, poziom poszczególnych składników. Wyniki uzyskane w testach mikrobiologicznych, z wykorzystaniem związków referencyjnych, nie powinny zniechęcać, gdyż niektóre, być może, wysoko aktywne związki występują w odpowiednich ekstraktach w niewielkich ilościach. W odniesieniu do poszczególnych grup związków, pod względem ilościowym i powszechności występowania, najliczniej występują związki fenolowe i ich analogii z grupy flawonoidów. Związki tego rodzaju jako substancje aktywne preparatów ochrony roślin należą do inhibitorów procesów energetycznych. Blokują one przede wszystkim przemiany, w których podstawową rolę odgrywa uwalnianie, a zarazem gromadzenie energii przez wytwarzanie ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej, zależnej od łańcucha oddechowego. Obecność ugrupowań hydroksylowych zwiększa możliwość oddziaływań litycznych na łańcuchy N-acetyloglikozoaminowe, a także polimery mannozowe i uronowe ścian komórkowych grzybów oraz penetrację hydrofilowych warstw białkowych cytoplazmy. Są to związki relatywnie bezpieczne, a preparaty stosowane w ochronie roślin od dawna, gdyż grzyby, nie zdołały, jak dotąd wypracować oporności na wskazany mechanizm działania i raczej się nie zanoszą. Równie interesujące, z uwagi na czynność izolatów, są wyniki badań ekstraktów z łupin orzecha i 5-hydroksy-1,4-naftochinonu zwyczajowo juglonu w postaci wolnej, jako głównego składnika tych ekstraktów. Związki z grupy chinonów również działają na szlaku oddechowym w odwracalnym procesie wiązania wodoru grup enzymatycznych, ale ich większa skuteczność w stosunku do fenoli wynika z możliwości udziału w reakcjach addycji grup karbonylowych, które tworzą wiązania kowalencyjne z zasadowymi grupami blokowanych układów biologicznych. Właściwości ekstraktów z zielonych łupin orzecha włoskiego są więc zachęcające, ale należy przeprowadzić dalsze badania. M. in. celowość dalszych prac potwierdziły doświadczenia pasieczne. Wyznaczono wielkości LD_{50} dla pszczoł w oddziaływaniu kontaktowym i w relacji zastosowania *per os*.

Rozważając jednak możliwość praktycznego zastosowania tego ekstraktu szczególnie niepokojące są wielkości dawek połowicznie śmiertelnych przy zastosowaniu juglonu w stosunku do ssaków (za piśmiennictwem). W teście *per os* wielkość LD₅₀ to 2,5 mg/kg m.c. (myszy), a LD_{LO} to 10 mg/kg m.c. (psy) po podaniu dożylnym (najniższa dawka śmiertelna). Podobne jest działanie przy podaniu dootrzewnowym. Jest to zatem związek szczególnie niebezpieczny lokowany w pierwszej klasie toksyczności. Odnosząc się do tych danych, zastanawia wielkość tolerowanej przez pszczoły dawki izolatu w testach *per os* i kontaktowym. Jak wynika z opisu przy jednorazowym podaniu, były to dawki progowo większe niż 0,2 mg na jeden biowskaźnik. W budowie niektórych zidentyfikowanych alkaloidów w ekstraktach jaskółczego ziela zwraca uwagę obecność form amoniowych, a we wszystkich związkach skondensowanego pierścienia metylenodioksolowego. Z uwagi na bierność chemiczną ugrupowań eterowych, tym bardziej stabilizowanych w pierścieni, interesujące byłoby wyszukanie relacji budowy i działania związków, w których występują inne grupy funkcyjne (zwłaszcza karbonylowa i amidowa).

Analizując budowę wszystkich związków przedstawionych w tabeli 20 i 39 uważam, że niektóre z nich warto by wyodrębnić (otrzymać w syntezie) i określić w jakich kierunkach mogą działać biologicznie. Celowe jak zwykle, byłyby też próby modyfikacji ich budowy i wyszukania zależności QSAR, a na tej podstawie prognozowanie aktywności związków o określonej budowie. W każdej z grup dla związków o zróżnicowanej budowie, interesujące byłoby statystyczne wyznaczenie wartości log P, wielkości powierzchni polarnej i rozpuszczalności związków w wodzie. Tego rodzaju dane mogą kierować uwagę na niektóre związki, gdyż ich aktywność, w stosunku do większości grzybów, warunkuje przede wszystkim ich powinowactwo fazowe.

W rozdziale „Dyskusja. Podsumowanie” Doktorantka podejmuje próby wyjaśnienia i powiązania wyników badań biologicznych. Jest to zadanie utrudnione, bowiem interpretacje zależności ograniczać mogą zjawiska inwersji działania i odstępstwa od relacji determinowanych udziałem ilościowym związku. Ograniczane są też możliwości wskazania wzajemnych interakcji związków w danej kombinacji.

W pracy zauważyłem pewne nieścisłości, uproszczone wypowiedzi oraz niekiedy niekompletne wyjaśnienia lub ich dyskusyjne formy.

- str. 22 – „inne grupy funkcyjne, np. grupa cukrowa”

- str. 23 – „wzrost liczby grup hydroksylowych w związkach fenolowych prowadzi do wzrostu aktywności biologicznej ” – przy tej okazji, proszę o wyjaśnienie, jaki jest charakter niespecyficzných interakcji komórkowych fenoli z białkami (str. 24)?

- str. 26 – „grupy hydroksylowe mogą by podstawione grupa metylową” (poprawnie – metylowane).

Dyskusyjny jest też zapis „podstawione grupa metoksyową”

- str. 26 – „podstawienie acylowe dając struktury aglikonowe”

- str. 27 – wiersz 1-3 – jest niezrozumiały, proszę o wyjaśnienie, i dalej ”bardziej lipofilowa natura flawonoidów” i dalej wiersz 4.

Podobnie nieprecyzyjny jest opis na stronie 28 „chinony to cykliczne ketony, w cząsteczce których grupy ketonowe znajdują się między innymi w pozycji 1,4 pierścienia benzoowego” i dalej „w wyniku kondensacji monocyklicznych benzochinonów z pierścieniami aromatycznymi” i dalej „są źródłem stabilnych wolnych rodników i tworzą kompleksy z nukleofilowymi aminokwasami w białkach” i dalej „efektem czego jest zaburzenie funkcji białka mikroorganizmów” i dalej „można podejrzewać, że kwarcytyna taką aktywność również posiada, tym bardziej, że ma więcej grup hydroksylowych” i dalej „fakt, że kwarcytyna jest inhibitorem fitopatogeniczności”, raczej może ograniczać wzrost i rozwój.

- str. 31 – „alkaloidy to związki zawierające azot w układzie heterocyklicznym” i dalej „głównie o charakterze zasadowym”

Podobnie nieprecyzyjna jest klasyfikacja, która odbiega od zadania wprowadzającego na tej samej stronie.

- str. 53 – „jonizacja elektronów”

- str. 68 – „mała zawartość związków biologicznie czynnych lub ich niestabilność jest prawdopodobnie przyczyną niewielkiej aktywności fungistatycznej” – taka interpretacja jest dyskusyjna, gdyż nie wszystkie związki w ekstrakcie muszą działa fungistatycznie lub działa w ogóle.

- str. 110 – „patogen najbardziej oporny na zmianę rozpuszczalnika macerującego” - należałoby wskazać , że jest to wpływ rozpuszczalnika na efektywność ekstrakcji związku i dalej, str. 110, cytowany zapis pojawia się ponownie.

Uwaga do wyników w tabeli 39

W kolumnie wartości m/z związków, dane są niekompletne, powinny by trzycyfrowe

- str. 146 – niewłaściwy jest opis wyników w tekście, w stosunku do Tabeli 44 „najlepsze działanie chloranil wykazuje względem *R. solani*, a stężenie powodujące 100% inhibicję jest przeszło 100 razy większe w porównaniu z ekstraktem z zielonych łupin” i dalej str. 146 – ostatnie zdanie jest też rozbieżne

W podsumowaniu swojej recenzji, pragnę wyrazić pogląd, iż oceniana rozprawa jest bardzo wartościowa i wnosi wiele do stanu wiedzy o budowie i właściwościach naturalnych związków. Z uznaniem stwierdzam też, że jest osiągnięciem oryginalnym, w znacznym stopniu inspirującym do dalszych dociekań i spełnia wymagania określone w ustawie o Tytule i stopniach naukowych. W związku z tym przedkładam Wysokiej Radzie wydziału Chemii UMCS w Lublinie, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Sylwii Garbaczewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ary K...' with a stylized flourish at the end.