

Dr hab. Robert Czajkowski, prof. UG
Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
Uniwersytet Gdański,
Tel.: +48 58 523 6333
Fax: +48 58 523 6426
E-mail: Robert.czajkowski@ug.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Kingi Lewtak zatytułowanej:
„Przeciwbakteryjna i przeciwgrzybowa aktywność ekstraktów otrzymanych z wybranych
gatunków roślin”, wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. Marty Fiołki, prof. UMCS.**

Powszechnie obserwowana antybiotykooporność mikroorganizmów patogennych dla człowieka jest uważana za jedno z największych zagrożeń dla ludzkości w XXI wieku. Zagrożenie to nie łączy się tylko z nowo odkrywanymi gatunkami patogennych grzybów i bakterii, izolowanymi z różnych środowisk, ale także i przede wszystkim, z nabywaniem przez szczepy znanych i dobrze scharakteryzowanych patogenów, nowych oporności na powszechnie stosowane terapie antybiotykowe. Przyczyny zjawiska antybiotykooporności mogą być różne, ale liczne dane literaturowe wskazują jednoznacznie, że najważniejszym czynnikiem powstawania oporności patogenów na antybiotyki jest nadużywanie tych związków i ich niewłaściwe stosowanie w skali globalnej. Odkrywanie nowych antybiotyków naturalnych, a tym bardziej opracowywanie nowych antybiotyków syntetycznych, jest procesem długotrwałym, kosztownym i co najważniejsze, bardzo często nie kończy się sukcesem, rozumianym jako wprowadzenie nowego antybiotyku na rynek. W tej sytuacji poszukiwanie alternatywnych metod leczenia zakażeń bakteryjnych i grzybowych u ludzi jest przedmiotem intensywnych badań wielu zespołów naukowców. Użytecznym źródłem związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej mogą być tkanki roślin, jak również ekstrakty z nich pozyskiwane.

Przedłożona do recenzji Rozprawa Doktorska Pani mgr Kingi Lewtak, wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Marty Fiołki, prof. UMCS, w Katedrze Immunobiologii i Katedrze Biologii Komórki, Instytutu Nauk Biologicznych, Uniwersytetu Marie Curie-Skłodowskiej w Lublinie,

podejmuje temat analizy aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów roślinnych otrzymywanych z roślin *Pelargonium zonale* (pelargonia rabatowa) i *Sida hermaphrodita* (ślazowiec pensylwański). Pomimo faktu, że zarówno pelargonia rabatowa jak i ślazowiec pensylwański były i są wykorzystywane w etnomedycynie jako naturalne środki lecznicze, a także rośliny te i związki z nich pozyskiwane są dość dobrze opisane i scharakteryzowane w literaturze, ciągle niewiele jest wiadomo o aktywności związków produkowanych przez te rośliny przeciwko wybranym przez Doktorantkę dwóm modelom badawczym. Modele badawcze, które Doktoranta wybrała do swojej pracy doktorskiej to: *Candida albicans* - patogen grzybowy, powodujący oportunistyczne grzybice u osób z obniżoną odpowiedzią immunologiczną, i *Mycobacterium smegmatis* - bakteria oportunistyczna, blisko spokrewniona z *Mycobacterium tuberculosis*, powodującą gruźlicę, która uznawana jest powszechnie za gatunek modelowy do badania mykobakterioz, powodowanych przez patogenne szczepy bakterii z rodzaju *Mycobacterium*. **Z tego względu temat podjęty przez Doktorantkę w projekcie doktorskim uważam za niezwykle istotny i nowatorski.**

Rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Lewtak została przygotowana w języku polskim i ma klasyczną i przyjętą powszechnie, dla tego rodzaju opracowań naukowych, formę. Rozprawa doktorska składa się z 180 stron, na których Autorka przedstawiła kolejno takie rozdziały pracy jak: Wykaz Stosowanych Skrótów, Streszczenie, Streszczenie w języku angielskim (Summary), Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Spis Literatury, Spis Tabel i Rycin oraz Aneks, zawierający życiorys naukowy Autorki. **Rozprawa doktorska jest bardzo bogato ilustrowana: zawiera 41 rycin, 7 tabel oraz obejmuje 176 pozycji literaturowych, licznie cytowanych w tekście.**

Szczegółowe omówienie poszczególnych części rozprawy doktorskiej:

Streszczenie i Streszczenie w języku angielskim (Summary) - oba streszczenia zawierają syntetyczne omówienie celu pracy, zastosowanych metod badawczych i otrzymanych wyników. Co więcej, oba Streszczenia zawierają krótkie podsumowanie najważniejszych obserwacji i wniosków uzyskanych z pracy doświadczalnej.

Wstęp - na 34 stronach Rozprawy Doktorskiej Autorka wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w swojej pracy: opisuje kolejno i bardzo szczegółowo dwa modele badawcze: *C. albicans* i *M. smegmatis*, ich czynniki wirulencji, cykl życiowy, przebieg zakażenia oraz stosowane obecnie terapie. Ponadto, Autorka opisuje dotychczasowy stan wiedzy w zakresie wykorzystania

roślin jako źródła związków przeciwdrobnoustrojowych oraz molekularne mechanizmy działania związków pochodzenia roślinnego w kontroli mikroorganizmów patogennych. W ostatnich podrozdziałach Wstępu, Doktorantka szczegółowo przedstawia wykorzystywane w pracy doktorskiej gatunki roślin: *P. zonale* i *S. hermaphrodita*. **Nie mam żadnych krytycznych uwag merytorycznych do tego rozdziału. Wstęp jest wyczerpujący i bardzo dobrze napisany. Co więcej, uważam, że informacje w nim zawarte mogłyby zostać wykorzystane do przygotowania krótkiej pracy przeglądowej w tematyce kontroli patogenów ludzkich z wykorzystaniem związków pochodzenia roślinnego. Pozostawiam ten pomysł do rozważenia dla Doktorantki i Pani Promotor.**

Cel pracy - jest przedstawiony w sposób klarowny. Główny cel pracy został podzielony na 7 celów szczegółowych, które zostały bardzo dobrze scharakteryzowane i opisane.

Materiały i Metody - rozdział ten składa się z dwóch powiązanych ze sobą w logiczny sposób podrozdziałów (podrozdział Materiały i podrozdział Metody), które w sposób jasny i szczegółowy przedstawiają opisy wszystkich materiałów i metod wykorzystywanych w przedstawionej pracy doktorskiej. Dokładne i rozbudowane opisy przeprowadzonych przez Autorkę doświadczeń uwidaczniają ogrom pracy włożonej przez Doktorantkę w przygotowanie i przeprowadzenie eksperymentów. Eksperymenty te zostały zaplanowane bardzo szczegółowo, zawierają dobrze dobrane kontrole i powtórzenia zarówno biologiczne jak i techniczne. **Dbłość o szczegóły pokazuje dużą skrupulatność i jakość wykonanej pracy, oraz takie przygotowanie wszystkich doświadczeń i eksperymentów, aby otrzymane wyniki były interpretowalne w jednoznaczny sposób. Skrupulatne przygotowanie przez Doktorantkę wszystkich doświadczeń zasługuje na duże uznanie.** Rozdział Materiały i Metody jest w dużej mierze wyczerpujący. Po przeczytaniu tego rozdziału nasuwają mi się następujące pytania do Doktorantki:

- Czy istnieją informacje o zmienności wewnątrzgatunkowej *P. zonale* i *S. hermaphrodita*? Czy zmienność wewnątrzgatunkowa roślin używanych w tej pracy doktorskiej mogłaby mieć znaczenie dla obserwowanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów z tych roślin pozyskiwanych?
- Czy dobrym pomysłem mogłoby być zastosowanie elicytacji roślin w celu zwiększenia stężenia związków o potencjale przeciwdrobnoustrojowym w ekstraktach *P. zonale* i *S. hermaphrodita*? Jeżeli tak, to jak taki eksperyment mógłby zostać zaplanowany?

Wyniki - ta część pracy doktorskiej Pani mgr Kingi Lewtak obok rozdziału Dyskusja, jest, moim zdaniem, najbardziej interesującym fragmentem przedstawionej pracy doktorskiej. Rozdział ten, (choć Autorka tego nie sygnalizuje w tekście) można podzielić na dwie części, którymi są: **część pierwsza** - dotycząca analizy aktywności ekstraktów roślinnych przeciwko bakteriom *M. smegmatis* i **część druga** - w której Autorka analizuje efekt przeciwdrobnoustrojowy ekstraktów wybranych roślin przeciwko grzybom *C. albicans*.

Doktorantka rozpoczęła swoje badania od wyboru ekstraktów, otrzymanych zarówno z różnych gatunków roślin jak i z różnych ich części, o największym potencjale w kontroli zarówno *M. smegmatis* jak i *C. albicans* (aktywność typu lizozymu). Na tej podstawie, spośród 16 ekstraktów, wybrała ekstrakty z łodyg podkwiatostanowych *P. zonale* i nasion *S. hermaphrodita* do dalszych badań ich aktywności przeciwko *C. albicans* i *M. smegmatis*.

Następnie Doktorantka oceniła przeżywalność komórek bakterii i grzybów traktowanych ekstraktem otrzymanym z łodyg *P. zonale* i nasion *S. hermaphrodita* i zaobserwowała, że przeżywalność zarówno *C. albicans* jak i *M. smegmatis* statystycznie istotnie maleje wraz ze wzrostem stężenia obu ekstraktów w eksperymencie.

- Pojawia się tutaj pytanie o długość czasu ekspozycji komórek bakterii i grzybów na działanie ekstraktów roślinnych. Doktorantka wybrała czas 6 dób dla eksperymentu z komórkami bakterii i 3 doby dla eksperymentu z komórkami drożdży. Skąd taki wybór czasów eksperymentu? Czy czasy te zostały wybrane na podstawie własnych badań wstępnych Doktorantki czy też może danych literaturowych?

W dalszej części badań, Pani mgr Lewtak wykonała analizy mikroskopowe traktowanych ekstraktami roślinnymi komórek bakterii i drożdży w celu określenia kondycji zarówno całych komórek, ich części składowych (badania ultrastruktury komórek grzybów) jak i ich powierzchni. W obu modelach badawczych Doktorantka zaobserwowała zmiany morfologiczne błon i ścian komórkowych, prowadzące do śmierci komórek. Podobnie, w obu przypadkach, Doktorantka zaobserwowała powstawanie konglomeratów zlepionych komórek o nieprawidłowej morfologii, sugerujące wpływ ekstraktów roślinnych na podziały komórkowe i oddzielanie się od siebie komórek potomnych po podziałach.

W celu szczegółowej analizy miejsca oddziaływania ekstraktów roślinnych na komórki *C. albicans* i *M. smegmatis*, Doktorantka posłużyła się technikami skaningowej mikroskopii

elektronowej, transmisyjnej mikroskopii elektronowej, mikroskopii sił atomowych, spektroskopii w podczerwieni czy spektroskopii Ramana. Użycie, wymienionych powyżej, technik pozwoliło jednoznacznie wykazać wpływ ekstraktów z roślin *P. zonale* i *S. hermaphrodita* na morfologię, morfogenezę, przeżywalność oraz powstawanie deformacji na powierzchni komórek obu modeli badawczych (bakterie i grzyby), przy czym wpływ ten rósł wraz ze wzrostem stężenia ekstraktów roślinnych w badanych próbach.

Kolejnym, ważnym elementem pracy doktorskiej Pani mgr Kingi Lewtak była ocena cytotoksyczności badanych ekstraktów roślinnych względem komórek linii prawidłowych fibroblastów ludzkich (linia HSF). Badania Doktorantki wykazały, że ekstrakt z *P. zonale* wykazuje właściwości cytotoksyczne, nawet przy relatywnie małych stężeniach w próbce, natomiast ekstrakt z nasion *S. hermaphrodita* takiej aktywności nie posiadał, nawet w najwyższych stosowanym stężeniu w próbce (200 µg/ml). Cytotoksyczność ekstraktu z *P. zonale*, jak zauważyła Autorka, ogranicza istotnie zastosowanie tego ekstraktu jako związku przeciwdrobnoustrojowego u ludzi.

- Czy, pomimo relatywnie wysokiej cytotoksyczności ekstraktu otrzymanego z *P. zonale*, istnieje możliwość zastosowania związków przeciwdrobnoustrojowych w nim obecnych w terapii chorób ludzi i zwierząt? Jeżeli tak, to jaką strategię należałoby podjąć, aby było to możliwe?

W dalszej części swojej pracy, Doktorantka skupiła się na identyfikacji i charakterystyce frakcji (i związków) odpowiadających za aktywność przeciwdrobnoustrojową ekstraktu z nasion *S. hermaphrodita*. W tym celu, Doktorantka również wykorzystwała szereg technik badawczych w tym: spektroskopię w podczerwieni, analizę elektroforetyczną, magnetyczny rezonans jądrowy, chromatografię gazową, spektroskopię Ramana oraz spektrometrię mas (MALDI i ESI LC-MS/MS). Analizy te pozwoliły wytypować związki aktywne we frakcjach ekstraktu z nasion *S. hermaphrodita* działające przeciwko *C. albicans* i *M. smegmatis* (to najprawdopodobniej, jak zasugerowała Doktorantka wicyliny i białka transportujące lipidy).

- Nasuwają się tutaj następujące pytania. Czy Doktorantka mogłaby zaproponować doświadczenia pozwalające jednoznacznie potwierdzić udział wytypowanych związków aktywnych w obserwowanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej? Jaki taki eksperyment mógłby wyglądać?

- Czy użyteczną metodą identyfikacji i charakterystyki związków aktywnych w tej pracy doktorskiej mogłaby być bioautografia z wykorzystaniem cienkowarstwowej chromatografii cieczowej? Jeżeli tak, to czy Doktorantka mogłaby teoretycznie opisać jak taki eksperyment mógłby zostać przeprowadzony?

Dyskusja - ten rozdział rozprawy doktorskiej Pani mgr Kingi Lewtak jest obok rozdziału Wyniki, **najbardziej interesujący**. Doktorantka bardzo umiejętnie dyskutuje otrzymane przez siebie wyniki badań z danymi literaturowymi w temacie projektu doktorskiego. **Dyskusja ma logiczny bieg, jest spójnie napisana i czytelna. Liczba cytowanych prac w rozdziale Dyskusja jest znaczna.** Dobór cytowanej literatury i struktura tego rozdziału uwidacznia bardzo dobrą znajomość tematyki badawczej. W mojej opinii, dobór literatury jest więcej niż poprawny. Co należy dodatkowo podkreślić, Autorka cytuje najnowszą literaturę w temacie projektu doktorskiego (prace z 2020 roku). Oznacza to, że Autorka na bieżąco śledzi literaturę w temacie rozprawy doktorskiej oraz w sposób odpowiedni modyfikuje swoją pracę naukową poprzez analizy prac naukowych innych badaczy. Uważam, że dyskusja wyników otrzymanych przez Doktorantkę w Jej projekcie doktorskim jest przeprowadzona w sposób **logiczny, prawidłowy i rzetelny.**

Wnioski - ten bardzo krótki rozdział, zawiera zebrane wnioski, które powstały w wyniku realizacji pracy doktorskiej. Autorka podsumowała pracę w postaci dwóch wniosków głównych, które zostały poparte 10 szczegółowymi obserwacjami. Przedstawione przez Doktorantkę wnioski są zasadne i bardzo dobrze poparte przez obserwacje, które poczyniła Pani mgr Lewtak w trakcie swojej pracy doktorskiej.

Literatura - spis literatury zawiera 176 pozycji. Jak napisałem wcześniej dobór literatury jest bardzo poprawny. Lista publikacji przygotowana jest bardzo starannie, publikacje obecne na liście literatury są cytowane w tekście rozprawy doktorskiej. Nie udało mi się znaleźć żadnej publikacji, będącej na tej liście, która nie byłaby cytowana w tekście i odwrotnie, takiej, która jest cytowana w teście, ale nie znajduje się na liście literatury.

Przygotowanie rozprawy doktorskiej i uwagi edytorskie - pod względem przygotowania edytorskiego i graficznego rozprawy doktorskiej, a także używanego przez Doktorantkę języka naukowego, **pracę oceniam bardzo wysoko.** Rozprawa doktorska została przygotowana bardzo

starannie, zawiera liczne schematy, ryciny i tabele, które nie tylko bardzo ułatwiają analizę wyników, ale je bardzo pięknie ilustrują. Na szczególną uwagę zasługują bardzo starannie wykonane zdjęcia preparatów mikroskopowych grzybów i bakterii, uwidaczniające zmiany morfologiczne komórek oraz zdjęcia z mikroskopu sił atomowych, obrazujące powierzchnie komórek. Drobne uchybienia edytorskie, które znalazłem w rozprawie doktorskiej, są tak nieistotne i tak rzadkie, że pozwolę sobie pominąć je w mojej recenzji.

Podsumowanie i Wniosek Końcowy:

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Lewtak stanowi oryginalny i ważny wkład Autorki w tematykę poszukiwania nowych związków przeciwdrobnoustrojowych pochodzenia roślinnego. Praca doktorska została prawidłowo i merytorycznie zaplanowana, przedstawia spójny ciąg myślowy, oraz prowadzi do istotnych odkryć naukowych. Część przedstawionych wyników badań została już opublikowana w postaci dwóch prac eksperymentalnych (w 2014 roku - w czasopiśmie Micron z grupy Elsevier i w 2019 roku - w czasopiśmie Scientific Reports z grupy Nature), w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Ponadto, Doktorantka jest współtwórcą wynalazku, chronionego patentem na terenie Polski - metody zwalczania zakażeń *C. albicans* z wykorzystaniem ekstraktu z nasion ślazuwca pensylwańskiego.

Autorka posłużyła się w swojej pracy szerokim warszatem metodycznym z zakresu mikrobiologii, analiz biochemicznych, metabolicznych, cytotoksycznych, biofizycznych i morfologicznych oraz technik obrazowania. Jakość przeprowadzonych badań pozwala mi stwierdzić, że Autorka cechuje się dużą biegłością w stosowaniu tego bardzo bogatego warsztatu bardzo różnych technik. Jak każda dobra praca naukowa, także ta, pozwala na wyznaczenie nowych celów badawczych i analizę nowych problemów naukowych.

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668) i dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Kingi Lewtak do dalszych etapów obrony rozprawy doktorskiej.

Jednocześnie, mając na uwadze wysoką ocenę merytoryczną prezentowanych badań, rzetelność Doktorantki w planowaniu i przeprowadzaniu eksperymentów oraz bogaty dorobek naukowy Doktorantki w tematyce metod kontroli patogenów ludzkich, wnoszę do Wysokiej Rady

Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o stosowne wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Kingi Lewtak.

Z wyrazami szacunku,



dr hab. Robert Czajkowski, prof. UG

Zakład Badania Związków
Biologicznie Czynnych

dr hab. Robert Czajkowski, prof. UG