

Gdańsk, dnia 15 maja 2015

**Prof. dr hab. Ewa Łojkowska**  
**Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin**  
**Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii**  
**Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**  
**Kładki 24, 80-822 Gdańsk**

**Recenzja rozprawy doktorskiej Moniki Styrzewskiej zatytułowanej  
„Identyfikacja i analiza składników włókna lnianego o właściwościach  
biomedycznych”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani **Moniki Styrzewskiej** została wykonana pod kierunkiem Pana profesora dr hab. Jana Szopy-Skórkowskiego w Zakładzie Biochemii Genetycznej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Tekst recenzowanej pracy doktorskiej obejmuje istotne i wymagane części składowe tj. streszczenie w języku angielskim i polskim, wstęp będący przeglądem literatury, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie wyników oraz spis literatury.

Przedstawiona do oceny rozprawa napisana jest jasnym i klarownym językiem, wyniki badań są dobrze udokumentowane, a całość reprezentuje nowoczesny kierunek badawczy polegający nie tylko na identyfikacji aktywności biologicznej wybranych metabolitów roślinnych ale także na scharakteryzowaniu mechanizmu warunkującego tę aktywność. Tkanki roślinne są znanym źródłem szerokiego spektrum substancji biologicznie czynnych, często wykorzystywanych jako farmaceutyki lub służących jako substraty do ich produkcji. O ile w wielu przypadkach znane jest działanie lecznicze metabolitów pochodzenia roślinnego o tyle mechanizm warunkujący ich działanie nie jest zwykle poznany.

Celem recenzowanej rozprawy było identyfikacja związków obecnych we włóknie lnianym, analiza właściwości biologicznych hydrofobowych składników włókna lnianego oraz identyfikacja czynników molekularnych determinujących produkcję, po raz pierwszy opisanego w tkankach lnu, kanabidiolu. Przedstawione zagadnienia są bardzo ciekawe naukowo ale mają także ważną znaczenie aplikacyjne, w szczególności dlatego, iż w trakcie badań przedklinicznych są zaprojektowane przez zespół prof. Jana Szopy opatrunki na trudno gojące się rany, których podstawę stanowi tkanina lniana.

Badania przeprowadzono w kilku etapach. W pierwszym zidentyfikowano metodami chromatograficznymi i spektrofotometrycznymi składniki hydrofobowe występujące we włóknie lnianym. W drugim etapie zbadano wpływ ekstraktu z włókna lnianego i zidentyfikowanych związków **na tempo proliferacji komórek fibroblastów i keranocytów**. Kolejną część pracy dotyczyła poznania molekularnych podstaw

indukowanych przez składniki włókna lnianego, a w szczególności zidentyfikowany po raz pierwszy w tkankach lnu kanabidiol, szlaków metabolicznych. Zbadano wpływ ekstraktu, kanabidiolu i  $\beta$ -sitosterolu na transkryptom fibroblastów ludzkich; oznaczono także poziom ekspresji wybranych genów w fibroblastach i keranocytach inkubowanych z ekstraktem z tkanek lnu oraz kanabidiolem i sitosterolem. W kolejnym etapie pracy przeanalizowano aktywność antybakteryjną ekstraktu zawierającego związki hydrofobowe ze szczególnym uwzględnieniem kanabidiolu. Ostatnia część badań opisanych w rozprawie doktorskiej jest poświęcona identyfikacji w komórkach lnu genu warunkującego biosyntezę kanabidiolu i oraz wykazaniu, iż nadekspresja genu kodującego syntazę kanabidiolu w komórkach lnu prowadzi do zwiększonej akumulacji tego związku.

Z dużym zainteresowaniem przeczytałam część teoretyczną pracy („Wstęp”) zawierającą wszechstronną charakterystykę całego spektrum metabolitów akumulowanych w roślinach a w szczególności w tkankach lnu. Doktorantka opisała budowę i znaczenie fenoli prostych, flawonoidów, lignanów, tanin, poliamin, terpenoidów prostych, karotenoidów, tokochochromanoli, steroli i kwasów tłuszczowych i związków kanabinoidowych. Szczególnie dokładnie opisano procesy biosyntezy kanabinoidów w komórkach roślinnych, ich funkcje w roślinach oraz ich aktywność biologiczną taką jak działanie psychotropowe, przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwbakteryjne. Całość przeglądu literatury jest napisana ciekawie i świadczy o znajomości przedmiotu badań.

Rozdział „Materiały i Metody” zawiera w pierwszej części wykaz wszystkich stosowanych odczynników, pożywek do hodowli bakterii i prowadzenia kultur *in vitro* komórek roślinnych oraz kultur fibroblastów i keranocytów oraz sekwencji oligonukleotydów używanych do analizy ekspresji badanych genów metodą Real-Time PCR. W drugiej części opisano zastosowane metody badawcze. Analiza części metodycznej oraz wyników rozprawy doktorskiej pozwala na stwierdzenie, iż doktorantka opanowała i z powodzeniem wykorzystwała w swoich badaniach wiele nowoczesnych metod i technik stosowanych w biotechnologii roślin (przygotowanie konstruktów do transformacji lnu i transformacja tkanek lnu), inżynierii genetycznej (izolację, oczyszczanie i analizę fragmentów DNA genomowego i plazmidowego, klonowanie, transformację komórek bakteryjnych, izolację i analizę RNA, analizy PCR i Real-Time PCR, analizę transkryptomu fibroblastów metodą mikromacierzy) i analizie fitochemicznej (ekstrakcja metabolitów, ich rozdział chromatograficzny za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej i chromatografii gazowej, analiza metabolitów metodą spektrometrii mas). Wskazuje także na umiejętność prowadzenia przez doktorantkę badań pozwalających na oznaczenie aktywności cytotoksycznej, proliferacyjnej i antybakteryjnej badanych związków a także sprawne posługiwanie się podstawowymi metodami bioinformatycznymi.

Podczas realizacji badań opisanych w recenzowanej rozprawie („Wyniki”) uzyskano wiele bardzo interesujących, a nawet odkrywczych wyników. Za najcenniejsze uważam następujące wyniki badań:

1) wykazanie po raz pierwszy, iż związek kanabinoidowy - kanabidiol jest wytwarzany w tkankach lnu; dotychczas uważano, iż związki te są obecne tylko w konopiach; istotne było wykazanie, iż kanabidiol jest obecny w ekstrakcie z tkanek lnu w ilości, która może efektywnie aktywować receptory CB2 lub GPR55,

2) stwierdzenie, iż kanabidiol jest akumulowany w tkankach lnu w wyższych stężeniach w warunkach stresu wywołanego niską temperaturą, zranieniem, zasoleniem czy też obecnością kwasu abscysynowego,

3) wykazanie pozytywnego wpływu ekstraktu związków hydrofobowych z włókna lnu na potencjał proliferacyjny ludzkich fibroblastów i keratynocytów oraz na indukcję procesu gojenia ran *in vitro*,

4) wykazanie, na podstawie analizy ekspresji wybranych genów związanych z reorganizacją macierzy zewnątrzkomórkowej, zmian ekspresji charakterystycznych dla aktywności biologicznej kanabinoidów i steroli; równocześnie wykazano, iż największą aktywność posiada ekstrakt hydrofobowy a składa się na nią zapewne synergistyczne oddziaływanie szeregu związków obecnych w ekstrakcie,

5) wykazanie, iż za aktywność przeciwzapalną i aktywność związaną z reorganizacją macierzy zewnątrzkomórkowej odpowiada kanabidiol, a w mniejszym stopniu sitosterol,

6) identyfikację w komórkach lnu genu warunkującego biosyntezę syntazy kwasu kanabidiolowego i wykazanie, iż w transgenicznym roślina lnu, do genomu których wprowadzono gen syntazy kwasu kanabidiolowego z konopii gromadzi się istotnie więcej kanabidiolu.

Uzyskane wyniki poza niewątpliwą wartością poznawczą mają ważny aspekt praktyczny. Wykazano bowiem, iż to obecny we frakcji hydrofobowej włókna lnu kanabidiol i  $\beta$ -sitosterol mają cenne właściwości proproliferacyjne i antybakteryjne a w związku z tym zastosowanie opatrunków przygotowanych na bazie włókna lnianego w leczeniu przewlekłych ran, np. owrzodzeń o etiologii cukrzycowej, może być uznane za uzasadnioną wynikami badań naukowych, racjonalną i innowacyjną terapię.

W rozdziale „Dyskusja” Pani mgr Monika Styrzewska w sposób kompleksowy i dojrzały przeanalizowała otrzymane w ramach przeprowadzonych badań wyniki i omówiła je w kontekście danych literaturowych. Wykazała, iż uzyskane wyniki pozwalają na wyjaśnienie na poziomie molekularnym mechanizmu działania składników ekstraktu hydrofobowego z tkanek lnu. W szczególności omówiła efekty oddziaływania na komórki fibroblastów i keratynocytów kanabidiolu, sitoseroli i kwasów tłuszczowych.

**Podsumowując stwierdzam, iż rozprawa doktorska Pani Monika Styrzewskiej zawiera bardzo cenne wyniki, a ich analiza pozwala na stwierdzenie, że doktorantka osiągnęła wszystkie założone cele.** Recenzowana rozprawa doktorska napisana jest dobrym językiem, wyniki badań są dobrze udokumentowane, a całość reprezentuje nowoczesny kierunek badawczy zmierzający do wykorzystania potencjału lnu do

opracowywania innowacyjnych leków, w tym przypadku funkcjonalnych opatrunków. Jest to tym bardziej cenne, iż len jest rośliną, która ma w Polsce długą tradycję uprawy a ostatnich dziesięcioleciach była niedoceniana.

Recenzowana rozprawa jest przygotowana starannie tak w odniesieniu do tekstu jak i dokumentacji graficznej i tabelarycznej. W tekście znalazłam drobne uchybienia, które polegają raczej na nie najszcześniejszych sformułowaniach (np. tłuszczowe kwasy wielonienasycone, lniana sekwencja genu syntazy kanabidiolu) i skrótach myślowych niż błędach.

Wyrażam uznanie dla Pani mgr Moniki Styrzewskiej i Pana Profesora Jana Szopy, Promotora rozprawy doktorskiej. Oceniana praca dokumentuje opanowany przez Panią magister warsztat naukowy, który umożliwia obecnie i w przyszłości prowadzenie ważnych, poznawczych i aplikacyjnych badań związanych z szerokim zastosowaniem metod inżynierii genetycznej do identyfikacji genów warunkujących biosyntezę związków biologicznie czynnych i tworzenia linii hodowlanych i odmian roślin o podwyższonej wartości dla przemysłu farmaceutycznego.

Warto podkreślić, iż część z opisanych w rozprawie wyników została już opublikowana w postaci dwóch publikacji, w których Pani Monika Styrzevska jest pierwszym autorem.

#### **Wniosek końcowy**

***W świetle przedstawionej powyżej, pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej Pani Moniki Styrzewskiej wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.***

