

Prof. dr hab. Maria Klein
Emerytowany profesor
Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Moniki Styrzewskiej
pt. „Identyfikacja i analiza składników włókna lnianego o właściwościach
biomedycznych”**

wykonanej w Zakładzie Biochemii Genetycznej, Wydziału Biotechnologii
Uniwersytetu Wrocławskiego
pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Szopy-Skórkowskiego

Tematyka rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Styrzewskiej wpisuje się w bardzo ważny obecnie nurt badań biochemicznych i molekularnych, których celem jest poszukiwanie związków bioaktywnych, występujących u roślin. Związki te mogą być następnie wykorzystane do sporządzania środków farmaceutycznych o skuteczniejszym działaniu niż dotychczas stosowane. W przedstawionej do recenzji pracy obiektem badań był len, który posiada wiele cennych właściwości, dlatego też jest wykorzystywany w różnych gałęziach przemysłu, a ostatnio także w medycynie. Praca doktorska Pani mgr Moniki Styrzewskiej jest kontynuacją badań nad tym gatunkiem, które od szeregu lat prowadzi zespół naukowców z Zakładu Biochemii Genetycznej pod kierunkiem Pana profesora Szopy-Skórkowskiego. Doktorantka przeprowadziła szerokie i bardzo interesujące badania biochemiczno-genetyczne nad składem włókien lnianych odkrywając kanabidiol - związek, którego występowanie, do tej pory, stwierdzono jedynie u roślin konopi. Autorka udowodniła także w szeregu eksperymentach, że włókna lnu mogą być wykorzystywane w przyszłości w celach medycznych do wspomagania leczenia trudno gojących się ran. Szeroki zakres wykonanych badań jak i nowoczesność technik badawczych zastosowanych w pracy zasługuje na uznanie, a otrzymane wyniki stanowią cenne uzupełnienie wiedzy o lnie

Praca doktorska Pani Moniki Styrzewskiej, jest szerokim opracowaniem liczącym 174 strony, o konstrukcji typowej dla rozpraw z zakresu nauk biologicznych. W wydzielonych 5 rozdziałach przedstawiono badania zaczynając od naświetlenia problemu, podania celu i metodyki badań, następnie wyników i ich dyskusji, na spisie literatury obejmującym aż 360 pozycji i podsumowaniu pracy kończąc. Pracę uzupełnia wykaz skrótów, streszczenie pracy w

językach polskim i angielskim oraz dane biograficzne. Dokumentacja wyników badań przedstawiona została w 5 tabelach, 16 wykresach i 17 rysunkach.

Uwagi szczegółowe

Wstęp, a właściwie przegląd literatury liczący 41 stron jest dość obszerny. Autorka scharakteryzowała w nim związki hydrofilowe i hydrofobowe występujące we włóknach lnu. Przedstawiła właściwości chemiczne szeregu grup pochodnych fenolowych, a zwłaszcza ich prozdrowotne działanie, które dotyczyło właściwości: antyoksydacyjnej, bakterio- i grzybobójczej oraz przeciwnowotworowej. Autorka szczególną uwagę poświęciła kanabinoidom. Opisała ich budowę, biosyntezę, a także funkcję biologiczną. W rozdziale tym Doktorantka wykazała bardzo dobrą znajomość literatury związanej zarówno z obiektem badań jak i biosyntezą metabolitów wtórnych u roślin. Rozdział ten mimo, że zawiera bardzo dużą liczbę informacji napisany jest jasno i przejrzysto. Jest też dobrym wprowadzeniem do badanych w pracy zagadnień.

Rozdział „**Materiały i metody**” dostarcza informacji o przebiegu eksperymentów, które zostały wykonane zgodnie z postawionymi celami pracy, których głównym zamierzeniem była identyfikacja i analiza właściwości biomedycznych hydrofobowych składników włókna lnianego. Wykonane eksperymenty zostały dobrze i logicznie zaplanowane oraz były konsekwencją kolejno otrzymywanych wyników. Szkoda, że Autorka nie przedstawiła ogólnego schematu obrazującego zakres wykonanych badań, który był bardzo szeroki i obejmował różne rodzaje zagadnień. W rozdziale „Materiał i metody” Autorka dokładnie przedstawiła użyte odczynniki, pożywki, linie komórkowe, szczepy bakteryjne oraz wektory plazmidowe i oligonukleotydy użyte w pracy, podając źródło pochodzenia oraz odnośną literaturę. Opisała szczegółowo zastosowane metody badawcze. Wśród nich były: analizy biochemiczne, chromatograficzne, genetyczne, transgeneza oraz kultury komórkowe ludzkich fibroblastów i keratynocytów, a także testy mikrobiologiczne. Należy podkreślić bardzo dobre przygotowanie Autorki do badań z genetyki molekularnej (znajomość metod stosowanych we współczesnej genetyce do analizy DNA i RNA), a także programów bioinformatycznych. Opis użytych przez doktorantkę technik genetycznych jest prawidłowy i nie budzi wątpliwości. Zastanawia jednak fakt, dlaczego autorka nie opisała metod w kolejności zgodnej z omawianymi wynikami? Ważną i pracochłonną częścią rozprawy doktorskiej, wymagającą specjalistycznej wiedzy, były badania transkryptomu fibroblastów ludzkich wykonane za pomocą mikromacierzy ekspresyjnych. Autorka w ramach tej części badań współpracowała z Zakładem Radiologii Doświadczalnej i Klinicznej Centrum Onkologii w

Gliwicach, gdzie dokonano hybrydyzacji transkryptów z macierzami genomu ludzkiego. Natomiast analiza metodami bioinformatycznymi otrzymanych danych została przeprowadzona we współpracy z Zakładem Inżynierii Systemów Instytutu Automatyki Politechniki Śląskiej. Badania te pozwoliły kompleksowo spojrzeć na zmiany w ekspresji genów wywołane w fibroblastach (po indukcji stanu zapalnego) przez ekstrakt z włókien lnu. W analizach biochemicznych badanej frakcji lnu Doktorantka umiejętnie posługiwała się 3 technikami: ultrasprawną chromatografią cieczową, chromatografią cienkowarstwową oraz spektrometrią masową, prawidłowo interpretując uzyskane chromatogramy. We wszystkich doświadczeniach Autorka odnosiła analizę otrzymanych danych do odpowiednio dobranej kontroli, a wnioskowanie przeprowadziła w oparciu o testy statystyczne. Śledząc opis przebiegu poszczególnych doświadczeń i stosowanych technik można stwierdzić, że Doktorantka była dobrze przygotowana do przeprowadzenia zaplanowanych badań.

Wyniki.

Wykonane badania poszerzyły wiedzę o budowie i właściwościach włókien lnu. Do najważniejszych osiągnięć naukowych Doktorantki można zaliczyć:

- określenie składu chemicznego frakcji hydrofobowej włókien lnu i wykrycie w niej obok kwasów tłuszczowych i steroli, kanabidiolu, związku unikalnie występującego w świecie roślin,
- potwierdzenie występowania kanabidiolu w różnych organach lnu oraz udowodnienie wpływu stresów abiotycznych oraz hormonów roślinnych na jego zawartość, co jest związane z aktywnością opisanego przez Autorkę genu syntazy kwasu kanabidiolowego, w sekwencji promotorowej którego odkryła elementy regulatorowe związane z reakcją na stresy,
- wykazanie w hodowlach ludzkich fibroblastów i keratynocytów, a także na podstawie analizy genów, których ekspresja jest związana ze stanem zapalnym, korzystnego wpływu badanego ekstraktu na zdolność proliferacyjną komórek, ich migrację oraz działanie przeciwzapalne,
- udowodnienie hamującego wpływu ekstraktu na wzrost bakterii *Staphylococcus aureus* oraz *Pseudomonas aeruginosa*, co może mieć znaczenie w leczeniu zakażeń wtórnych, występujących w przypadkach trudno gojących się ran,
- uzyskanie linii transgeniczných lnu o zwiększonej zawartości kanabidiolu przez wprowadzenie do genomu genu syntazy kwasu kanabidiolowego, ważnego ogniwa w jego biosyntezie.

Wyniki obejmujące 48 stron są dobrze udokumentowane rysunkami, wykresami i tabelami. Opisy eksperymentów są czytelne i uporządkowane. Mam jednak wątpliwość czy zawarty w podrozdziałach od 4.3.3.1 do 4.3.3.4 dość skomplikowany opis sposobu przekształceń i normalizacji danych otrzymanych z analizy mikromacierzy ekspresyjnych był potrzebny w tym rozdziale. Opisy te stanowią integralną część metodyki badań i tam ewentualnie mogły być zamieszczone. Ważnym było spostrzeżenie Autorki, że w kilku przypadkach wystąpiła synergia w działaniu badanego związku z innymi składnikami ekstraktu, co dało się zauważyć porównując dane po stosowaniu ekstraktu i czystego chemicznie kanabidiolu. Takie przypadki odnotowano między innymi w badaniach nad morfologią komórek i ich migracją. Autorka ocenę zmiany morfologii fibroblastów i keratynocytów przeprowadziła jedynie wizualnie i udokumentowała je niezbyt czytelnymi zdjęciami (rys. 9,10). Dla potwierdzenia zauważonych zmian powinny być wykonane pomiary długości i szerokości komórek. W odróżnieniu od pozostałych rozdziałów bardzo pobieżnie zostały omówione badania nad transgenezą, a były one ważną i perspektywiczną częścią pracy. Jaki jest dalszy los uzyskanych linii transgenicznych?

Wartościową częścią rozprawy doktorskiej Pani Moniki Styrzewskiej jest rozdział „**Dyskusja**” napisany w sposób jasny i logiczny. Autorka omówiła w nim otrzymane wyniki zwracając szczególną uwagę na prozdrowotne właściwości związków wykrytych we frakcji hydrofobowej włókien Inu. Doktorantka potwierdziła w tym rozdziale swoją szeroką wiedzę i znajomość literatury. Należy wspomnieć, że większość cytowanych publikacji pochodzi z ostatniego 10-lecia i obejmuje najnowszą wiedzę na temat funkcji i prozdrowotnych właściwości kanabinoidów. Zwraca uwagę umiejętność łączenia faktów z różnych dziedzin biologii, genetyki molekularnej i medycyny w celu wyjaśnienia mechanizmów działania kanabidiolu na komórki ludzkie oraz drobnoustroje, a także dbałość o rzeczowe wyjaśnienie wszystkich wątpliwości, jakie nasuwają się po analizie wyników. Rozdział ten oceniam bardzo wysoko.

Na zakończenie Doktoranta dokonała „**Podsumowania**” wykonanych badań wypunktowując 10 zagadnień, którymi się zajmowała. Szkoda, że autorka wykonując tak szeroki zakres badań sformułowała tylko jeden wniosek. Brakuje mi sugestii o kierunku dalszych badań lub propozycji rozwiązań aplikacyjnych. Przy przygotowywaniu publikacji do druku Doktorantka powinna zwrócić uwagę na ujednoczenie literatury, bowiem część tytułów prac napisana jest dużymi a część małymi literami, a także dokonanie większej selekcji w cytowanych publikacjach. Należy także skorygować dość często występujący błąd dotyczący pisowni nazw łacińskich roślin i mikroorganizmów. Zgodnie z zasadami powinno pisać się je

kursywą. Także tytuły tabel powinny być umieszczone w nagłówku, a nie pod spodem. Należy zwrócić uwagę na czytelność zamieszczonych wykresów i rysunków. Niektóre z nich są zbyt małe, co utrudnia analizę danych. Niezbyt czytelny jest rys. 8, którego interpretacja stwarza problemy. Dla uproszczenia rysunki i wykresy powinno się oznaczać jako ryciny, co jest przyjęte w większości czasopism. Autorka nie uniknęła także błędów nomenklaturowych. Poprawne nazwy to: widma a nie spektra, kwas trifluorooctowy a nie trójfluorooctowy, gaz nośny a nie nośnik gazowy. Rażą też sformułowania: lniane związki terpenofenolowe, lniane geny, lniane frakcje itd. Inne zauważone błędy literowe, gramatyczne i stylistyczne zaznaczyłam w maszynopisie pracy i są do wglądu dla Doktorantki.

Reasumując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma dużą wartość poznawczą i stanowi podwaliny dla wykorzystania aplikacyjnego. Autorka zrealizowała szeroko zakrojony projekt badawczy, który pozwolił wykryć występowanie kanabidiolu - biologicznie aktywnego związku w roślinach lnu i wytworzonych z niego produktach. W oparciu o analizę genomu, hodowle komórkowe i bakteryjne udowodniła jego korzystne właściwości w leczeniu ran oraz w hamowaniu rozwoju chorobotwórczych bakterii. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury oraz bogatym i nowoczesnym warształem badawczym. Przedstawiona do recenzji praca ma charakter nowatorski i stanowi ważne uzupełnienie wiedzy o lninie i możliwościach jego wykorzystania.

W związku z powyższym stwierdzam, że **praca doktorska Pani Moniki Styrzewskiej spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim** wg Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, określone w art. 13 Ustawy (Dz. U. 2003 Nr 65, poz. 595, z późn. zm., nowelizacja Dz. U. 2011 nr 84 poz. 455, Dz. 2014. poz. 1198 z 2014). Ponadto dorobek naukowy Doktorantki uzasadnia Jej starania o nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia. Wniosuję do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie dysertacji i dopuszczenie Pani mgr Moniki Styrzewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na nowatorski charakter opracowania wniosuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



prof. dr hab. Maria Klein

Kraków, 12 maja 2015 roku