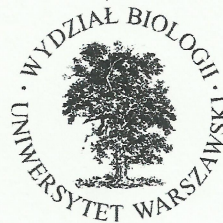




UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biochemii, Zakład Biochemii Roślin



Dr hab. Anna Szakiel, prof. UW

Warszawa, 2020-02-10

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Barbary Moniuszko-Szajwaj
pt. „Saponiny z korzenia mydlnicy lekarskiej (*Saponaria officinalis* L.) – budowa chemiczna,
oznaczanie ilościowe i aktywność biologiczna”**

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska wykonana w Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Stochmal. Rozprawa wchodzi w zakres dziedziny nauk rolniczych, dyscypliny: rolnictwo i ogrodnictwo. Podstawą formalną recenzji jest pismo Rady Naukowej IUNG-PIB w Puławach RN.470.3.2019.BE z dnia 20.12.2019 r. Przedstawiona do recenzji dysertacja liczy 161 stron, ma układ treści typowy dla prac eksperymentalnych – obejmuje wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki i dyskusję, podsumowanie i wnioski, a także streszczenie w języku polskim i angielskim, literaturę oraz stosowne spisy i załączniki.

Rozprawa doktorska Pani mgr Barbary Moniuszko-Szajwaj jest szeroko zakrojoną charakterystyką saponin z korzenia mydlnicy lekarskiej *Saponaria officinalis*, przeprowadzoną pod kątem ustalenia ich pełnej struktury chemicznej, analizy ilościowej poszczególnych saponin, określenia składu i zawartości tych związków w korzeniach mydlnic pochodzących z różnych stanowisk, a także zbadania wybranych aktywności biologicznych: allelopatycznej, przeciwgrzybowej i hemolitycznej. Jest to zatem typowa praca fitochemiczna poświęcona określonej grupie związków występujących w wybranym surowcu roślinnym, mająca na celu weryfikację i uporządkowanie istniejących danych na temat ich struktury, ewentualną identyfikację związków dotąd nieznanych, ewaluację możliwego zróżnicowania jakościowego i ilościowego oznaczonych związków w surowcach różnego pochodzenia oraz zbadanie potencjalnie interesujących aktywności biologicznych. Recenzowana rozprawa została zrealizowana według tego klasycznego i sprawdzonego schematu, trzeba jednak podkreślić, że zarówno bardzo rozbudowany, wielowątkowy wstęp, jak i otrzymane przez Autorkę oryginalne wyniki i ich interpretacja bynajmniej schematyczne nie są, praca jest bardzo interesująca, wartościowa i dostarcza nowych ważnych danych dotyczących budowy i właściwości saponin roślinnych.

W obszernym wstępie Autorka definiuje i klasyfikuje saponiny, charakteryzuje ich właściwości fizykochemiczne i aktywności biologiczne, zwraca też uwagę na znaczenie tych związków w rolnictwie, ich wykorzystanie komercyjne i potencjał przemysłowy. Dużą część wstępu zajmuje omówienie występowania saponin w roślinach przeprowadzone z punktu widzenia systematyki taksonomicznej. Na szczególną uwagę zasługuje imponujący rozdział o występowaniu saponin w rodzinie goździkowatych (*Caryophyllaceae*), w którym Autorka umieściła ogromną, 12-stronicową tabelę ze strukturami dotychczas poznanych saponin uporządkowanych według gatunków roślin i uwzględniających występowanie tych związków w poszczególnych organach (korzeniach, częściach nadziemnych, nasionach). W literaturze można znaleźć znacznie skromniejsze zestawienie z 2011 roku (Böttger i Melzig, *Phytochemistry Letters*; cytowane w rozprawie), natomiast dane prezentowane aktualnie przez Autorkę zostały uściśnione, uaktualnione i lepiej usystematyzowane.

Część eksperymentalna rozpoczyna się od jasno i zwięźle sformułowanych założeń i celu pracy, rozpisanego na poszczególne zadania, które postawiła przed sobą Doktorantka. Zastosowane metody opisane są poprawnie i z dbałością o podanie najistotniejszych szczegółów procedur. Instytut, w którym Pani mgr Moniuszko-Szajwaj przygotowywała swoją rozprawę, jest wiodącą placówką badawczą w zakresie ustalania struktury metabolitów roślinnych, co znajduje odzwierciedlenie w jakości przedstawionej pracy eksperymentalnej i adekwatności zastosowanych metod analitycznych.

Za dwa najważniejsze i najbardziej spektakularne osiągnięcia Autorki rozprawy można bez wątpienia uznać wyizolowanie i określenie struktury chemicznej saponin występujących w korzeniu mydlnicy lekarskiej oraz opracowanie metody ich oznaczania ilościowego. Stosując metody ekstrakcji do fazy stałej, frakcjonowania za pomocą ekstrakcji ciecz-ciecz oraz różnych, zastosowanych sekwencyjnie technik chromatograficznych (cieczowej, sita molekularnego) Autorka wyodrębniła z wyjściowego ekstraktu z korzenia mydlnicy 19 saponin, których struktury chemiczne zidentyfikowała następnie metodami spektralnymi (spektrometrii mas, MS i magnetycznego rezonansu jądrowego, NMR). Oczyszczanie saponin i określanie ich struktury to jedno z najtrudniejszych, najbardziej skomplikowanych i wymagających żmudnej pracy wyzwań fitochemii, tak więc doprowadzenie do uzyskania 19 wyizolowanych i oczyszczonych związków oraz charakterystyka ich struktury, włączając konfigurację łańcuchów cukrowych, jest godnym podkreślenia sukcesem Autorki. Spośród tych scharakteryzowanych związków, 8 saponin to związki nowe, nieopisane dotychczas w literaturze; natomiast występowanie dwóch spośród znanych saponin zostało po raz pierwszy stwierdzone w mydlnicy (według danych literaturowych, związki te zidentyfikowano dotychczas w goździku chińskim i krowiziele zbożowym). Autorka porównała scharakteryzowany w jej pracy profil saponin z wynikami uzyskanymi przez zespół

japoński [Jia, Koike i wsp.] w końcu lat 90-tych XX-wieku, wykazując brak zidentyfikowanych wcześniej przez Japończyków czterech saponariozydów - i tłumacząc zaobserwowaną różnicę bądź zmiennością populacyjną roślin, bądź występowaniem tych brakujących saponin w częściach nadziemnych mydlnicy, gdyż aktualne wyniki dotyczą tylko korzeni, a prace japońskie całej rośliny. Następnie opracowała metodę ilościowego oznaczania saponin za pomocą chromatografii cieczowej sprężonej ze spektrometrem mas wyposażonym w potrójny kwadrupol UPLC-ESI-MS. Metoda ta służy do ilościowego oznaczenia niezmodyfikowanych saponin we frakcji saponinowej otrzymanej w wyniku ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Opracowaną metodę Autorka wykorzystwała do porównania zawartości saponin w korzeniach mydlnicy pochodzących z różnych stanowisk w Polsce i na Ukrainie, oraz poletka doświadczalnego IUNG-PIB w Puławach. Wykazała, że badane rośliny różnią się całkowitą zawartością saponin (najwyższą zawartość, 7,4% suchej masy, Autorka oznaczyła w korzeniu mydlnicy zakupionym w Herbapolu i służącym do podstawowych badań nad strukturą saponin; zbliżoną zawartością (ok. 7%) charakteryzowały się korzenie z naturalnych siedlisk koło Zaklikowa w województwie podkarpackim i Mszańca na Ukrainie, a ponad dwukrotnie mniejszą zawartość saponin wykazały próbki korzeni z niektórych stanowisk w okolicach Puław, Płońsk oraz rejonu Warmińsko-Mazurskiego). Co jeszcze bardziej ciekawe, badane rośliny różniły się także w istotny sposób profilem jakościowym, czyli składem saponin, żadna z badanych mydlnic nie zawierała wszystkich saponin zidentyfikowanych w pierwszej próbce zakupionej w Herbapolu, istotne różnice dotyczyły nawet związku dominującego, którym w części zebranych korzeni był saponariozyd C, w części saponariozyd D lub I, a w jednej próbce saponariozyd G. Te wyniki zdają się zatem potwierdzać przypuszczenia Autorki co do dużej zmienności populacyjnej mydlnicy i w ich kontekście przestają dziwić rozpatrywane wcześniej różnice obserwowane w zestawieniu wyników Doktorantki z cytowanymi pracami japońskiej grupy badaczy.

Kolejna część rozprawy została poświęcona badaniu wybranych aktywności biologicznych saponin z korzeni mydlnicy. Do biotestów Autorka użyła liofilizowanej frakcji saponin, a także – w przypadku badania aktywności hemolitycznej – podfrakcji saponin o wyższej polarności. Potencjał allelopatyczny (czy też aktywność fitotoksyczna) saponin mydlnicy został oszacowany przy użyciu testu na hamowanie kiełkowania nasion oraz wzrostu pędów i korzeni kilku roślin testowych. Doktorantka wykazała, że hamowanie kiełkowania zachodzi w niewielkim stopniu (niskie stężenia frakcji saponinowej w przypadku nasion niektórych roślin nawet stymulowały kiełkowanie), natomiast bardziej istotny efekt zachodzi w przypadku hamowania wzrostu siewek roślin testowych, a zwłaszcza ich korzeni. Aktywność przeciwgrzybową Doktorantka zbadała metodą dyfuzyjno-krażkową wobec grzybów patogennych zbóż (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* i *Fusarium culmorum*), wykazując większą zdolność saponin mydlnicy do hamowania wzrostu *G. graminis* niż *F. culmorum*. W teście hemolitycznym (jakościowym i ilościowym) Doktorantka

wykazała, że zarówno całkowita frakcja saponin z korzenia mydlnicy, jak i wyodrębniona subfrakcja bogata w glikozydy kwasu kwilajowego, działają na czerwone krwinki silnie hemolizująco, efekt ten jest silniejszy niż wywierany przez komercyjną mieszaninę saponin Merck®. Część rozprawy poświęcona aktywnościom biologicznym saponin zawiera bardzo interesujące dyskusje przeprowadzone w oparciu o literaturę naukową, zwłaszcza wyniki oryginalnych prac eksperymentalnych różnych zespołów badawczych. Na uznanie szczególnie zasługują wnikliwe rozważania Autorki dotyczące zależności między aktywnością hemolityczną a budową strukturalną cząsteczki saponin. Trzeba tu podkreślić, że znajomość literatury naukowej i dobór cytowanych publikacji jest mocną stroną Doktorantki, spis bibliografii umieszczony w dysertacji jest wyjątkowo bogaty i liczy 261 pozycji.

Rozprawę doktorską Pani mgr Barbary Moniuszko-Szajwaj oceniam merytorycznie bardzo wysoko, ale obowiązkiem recenzenta jest także wskazanie niedociągnięć oraz zasygnalizowanie wątpliwości, które mogą pojawić się w trakcie czytania dysertacji. Moja pierwsza uwaga dotyczy sformułowania z rozdziału 1.3. wstępu (Biosynteza saponin) mówiącego, że saponiny pochodzą z metabolitów anabolicznych fitosteroli. Czy stwierdzenie to dotyczy wszystkich saponin, nie tylko steroidowych, ale także triterpenoidowych? Na następnej stronie Autorka pisze, że 2,3-oksydoskwalen jest uważany za ostatni wspólny prekursor saponin triterpenoidowych, fitosteroli i saponin steroidowych, co poniekąd przeczy wcześniejszej tezie.

Kolejną uwagą jest brak oceny statystycznej istotności otrzymanych wyników, zwłaszcza tych dotyczących oznaczeń ilościowych saponin i niektórych aktywności biologicznych. Autorka pisze, że wszystkie doświadczenia wykonała w co najmniej trzech powtórzeniach i podaje wartości odchylenia standardowego, dysponując tymi danymi mogła zatem wykonać odpowiednie testy statystyczne pozwalające stwierdzić, na ile istotne są opisywane różnice wyników.

Podając wyniki testów hemolitycznych, Autorka umieściła w tabelach procent hemolizy z dokładnością do trzeciego miejsca po przecinku, co w tym przypadku jest precyzją raczej przesadną i wymagałoby jednak rozsądnego zaokrąglenia. Ponadto wyniki testów hemolitycznych wynoszących 112 czy 114% (w stosunku do wyniku uzyskanego dla wody destylowanej określonej jako maksymalna – czyli 100%-owa kontrola hemolityczna) wymagałyby jednak jakiegoś komentarza, podobnie jak pojawiający się w Tabeli 11 procent ujemny.

Doktorantka nie wspomina, w jaki sposób zidentyfikowano użyte do badań aktywności przeciwgrzybowej izolaty grzybów patogennych. Izolaty grzybów bardzo często uzyskuje się z materiału biologicznego (a nawet po prostu z powietrza, w którym unoszą się ich zarodniki), jednak w takich przypadkach, gdy nie pochodzą one z certyfikowanych kolekcji, ich identyfikacja wymaga potwierdzenia.

Rozprawa napisana jest poprawnym językiem naukowym, chociaż Autorka nie ustrzegła się pewnych typowych niedociągnięć redakcyjnych i literówek (amaryna - amyryna, olean – oleanan, glukopiranosylo- i glukopiranozylo- używane zamiennie w jednej nazwie saponiny, itp.), wyrażen żargonowych (krzywa dawka-odpowiedź; procent efektu działania; koncentracja zamiast stężenie) oraz błędów interpunkcyjnych. Oczywiście te niedociągnięcia są drugorzędne i ani nie obniżają wartości rozprawy, ani nie utrudniają czytania czy zrozumienia tekstu, natomiast ich zauważenie wchodzi w zakres obowiązków recenzenta.

Przedstawione powyższej uwagi krytyczne nie wpływają na ogólną wysoce pozytywną ocenę merytoryczną dysertacji. Należy ponadto zauważyć, że zawarte w rozprawie wyniki dotyczące identyfikacji struktury chemicznej saponin z korzenia mydlnicy zostały opublikowane w postaci oryginalnych prac naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (*Natural Product Communications, Helvetica Chimica Acta*), a Doktorantka pełni w nich rolę pierwszego i korespondującego autora.

Podsumowując należy podkreślić, że przedstawiona przez Panią mgr Barbarę Moniuszko-Szajwaj rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dowodzi posiadania przez Doktorantkę szerokiej wiedzy teoretycznej, znajomości wielu metod eksperymentalnych, umiejętności planowania doświadczeń i doboru odpowiednich technik analitycznych, a także potwierdza nabycie przez nią umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska Pani mgr Barbary Moniuszko-Szajwaj spełnia warunki ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie Autorki do dalszego toku przewodu doktorskiego i publicznej obrony. Biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny i zakres przeprowadzonych badań, wnioskuję także o wyróżnienie pracy.

