



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

PRACOWNIA BIOLOGII FARMACEUTYCZNEJ I BIOTECHNOLOGII

KATEDRA I ZAKŁAD KOSMETOLOGII PRAKTYCZNEJ I PROFILAKTYKI CHOROÓB SKÓRY

Collegium Pharmaceuticum

ul. Rokietnicka 3

tel. 506135359

60-806 Poznań

e-mail: kikowska@ump.edu.pl

Poznań, 22.05.2023

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora nauk farmaceutycznych

zatytułowanej „**Kultury transformowanych korzeni i pędów *Salvia bulleyana* Diels
jako źródło bioaktywnych metabolitów**”

wykonanej przez **mgr Martę Krzemińską**

w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Katedry Biologii i Biotechnologii
Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

pod kierunkiem **dr hab. n. farm. Izabeli Grzegorzczak-Karolak, prof. UM**

Niniejszą recenzję przygotowano w odpowiedzi na pismo Przewodniczącej Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, prof. dr hab. n. med. Anny Kilanowicz-Sapota, z dnia 28.03.2023 roku, z prośbą o przyjęcie funkcji recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Marty Anny Krzemińskiej.

Dorobek naukowy Pani mgr Marty Krzemińskiej obejmujący wyniki opisywane w rozprawie doktorskiej to 3 oryginalne artykuły naukowe w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (*Journal of Biotechnology* MNiSW/MEiN=70, IF=3,595; *Molecules* MNiSW/MEiN=140, IF=4,927; *International Journal of Molecular Sciences*, MNiSW/MEiN=140, IF=6,208) o sumarycznej wartości IF=14,73 i punktacji MNiSW/MEiN równej 350. O aktywności naukowej Doktorantki świadczy także przedstawienie wyników pracy doktorskiej w postaci 8 doniesień zjazdowych na krajowych konferencjach.

Pozostały dorobek naukowy stanowią 3 oryginalne artykuły naukowe (1 x *Metabolites*, MNiSW/MEiN=100, IF=4,932; 2 x *Biomolecules*, MNiSW/MEiN=100, IF=6,064) oraz 2 przeglądowe artykuły (2 x *Farmacja Polska*, MNiSW/MEiN=70) o sumarycznej wartości IF=17,06 i punktacji MNiSW/MEiN równej 440.

Podsumowując, łączny dorobek Doktorantki to 8 artykułów naukowych o sumarycznej wartości IF=31,79 i punktacji MNiSW/MEiN równej 790.

OCENA MERYTORYCZNA

Materiałem badawczym Doktorantki był mało rozpowszechniony na świecie gatunek szalwii *Salvia bulleyana*, substytut *Danshen*, stosowany w medycynie ludowej Chin głównie w chorobach układu krążenia, w tym w dusznicy bolesnej, zapaleniu i marskości wątroby, przy bolesnym miesiączkowaniu oraz w bezsenności. Takson ten swoje szerokie spektrum właściwości biologicznych / farmakologicznych oraz zastosowanie w tradycyjnym ziołolecznictwie zawdzięcza bogatemu składowi cennych bioaktywnych związków, w tym związkom fenolowym m.in. kwasom fenolowym i ich pochodnych, flawonoidom oraz diterpenoidom i kwasom organicznym. Celem badań, opisanych w niniejszej rozprawie przedłożonej na stopień doktora nauk farmaceutycznych, było zastosowanie wyselekcjonowanych zabiegów biotechnologicznych (selekcja klonów, modyfikacje w zakresie rodzaju pożywki, stężeń witamin i sacharozy, typów regulatorów wzrostu i rozwoju roślin, elicytacja jasmonianem metylu, *trans*-anetolem, ekstraktem drożdżowym, wykorzystanie różnych źródeł i długości światła) dla uzyskania wysoko produktywnych kultur korzeni / pędów transformowanych *Salvia bulleyana* oraz wydajna hodowla cennej biomasy w różnych systemach wzrostowych, w tym bioreaktorowych. Ponadto, ekstrakty z korzeni transformowanych tego cennego i znanego z medycyny tradycyjnej Chin taksonu poddane zostały badaniom biologicznym – zbadana została aktywność przeciwutleniająca, cytotoksyczna oraz przeciwdrobnoustrojowa. Optymalizacja warunków hodowli biomasy oraz zastosowanie zabiegów biotechnologicznych pozwoliły uzyskać wydajne hodowle transformowanych korzeni i pędów *S. bulleyana*, które mogą stanowić cenne alternatywne źródło związków fenolowych, głównie kwasu rozmarynowego o bardzo silnym działaniu przeciwutleniającym i znaczącej aktywności cytotoksycznej. Doktorantka stawia konkluzję, że w przyszłości surowiec ten może znaleźć zastosowanie w terapii i profilaktyce chorób cywilizacyjnych.

Jest to wartościowe opracowanie obejmujące nowoczesne rozwiązania z zakresu biotechnologii roślin, fitochemii i badań biologicznej aktywności biomasy organów transformowanych. Badania objęte niniejszą pracą doktorską są nowatorskie i potencjalnie aplikacyjne. Doktorantka swój sukces zawdzięcza w dużym stopniu wysokiej pozycji naukowej Prof. Izabeli Grzegorzczak-Karolak, która jest uznanym autorytetem w zakresie otrzymywania i hodowli korzeni transformowanych oraz analiz fitochemicznych.

Strona formalna pracy nie budzi zastrzeżeń. Praca napisana jest poprawnym językiem naukowym bez błędów stylistycznych i gramatycznych. Zarówno część teoretyczna jak i doświadczalna opisane są w sposób zrozumiały dla odbiorcy.

OCENA METODOLOGICZNA

Spis pozycji piśmienniczych zawiera aż 317 pozycji. Zdecydowana większość to anglojęzyczne artykuły naukowe renomowanych czasopism z listy filadelfijskiej opublikowane w ostatniej dekadzie, co świadczy o ich aktualności. Dobór źródeł oceniam na właściwy.

Doktoranta we właściwy sposób nakreśla cel pracy adekwatny do problemu badawczego oraz realizowane zadania badawcze dotyczące badań z zakresu biotechnologii roślin, biologii molekularnej, fitochemii. Jednakże brakuje postawionej hipotezy.

W niniejszej pracy badawczej Doktorantka wykazała się znajomością:

- metod hodowli / selekcji / oceny transformowanych korzeni i pędów w kontrolowanych warunkach *in vitro*,
- zastosowania technik biotechnologicznych, w tym zróżnicowanych biotycznych i abiotycznych elicytorów w celu podwyższania zawartości cennych metabolitów wtórnych,
- analizy jakościowej biomasy przy użyciu ultra wysokosprawnej chromatografii ciekłej sprzężonej ze spektrometrem mas (UHPLC-PDA-ESI-MS),
- analizy jakościowej z zastosowaniem metody wysokosprawnej chromatografii ciekłej (HPLC),
- określania zdolności przeciwutleniających ekstraktów testami aktywności przeciwrodnikowej: DPPH, ABTS i NBT; redukcji jonów żelaza: FRAP; zahamowania peroksydacji lipidów: TBARS,

- oceniania cytotoksyczności komórek nowotworowych traktowanych wybranymi ekstraktami roślinnymi przy użyciu testu redukcji MTT,
- określania aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej przy użyciu metody mikrorozcieńczeń rekomendowanej przez EUCAST,
- zastosowania metod biologii molekularnej,
- analizowania danych przy pomocy testu ANOVA, której następstwem był test post-hoc opracowany przez Johna Tukey'a czy Kruskala-Wallisa.

Układ pracy doktorskiej jest prawidłowy. Praca zawiera spis skrótów stosowanych w pracy, część teoretyczną dotyczącą systematyki, charakterystyki, występowania i zastosowania *Salvia bulleyana*, opisu głównych metabolitów wtórnych obecnych w gatunku oraz znaczenia biotechnologii roślin w otrzymywaniu wydajnego i jednorodnego surowca roślinnego, cel badań i zakres realizowanych działań badawczych. W części doświadczalnej przedstawiony został badany materiał roślinny, metodyka z roślinnych kultur *in vitro*, analiz fitochemicznych, badań biologicznych oraz analizy statystycznej a w dalszej kolejności wyniki wraz z dyskusją wyników oraz wnioski. W pracy znajduje się streszczenie w języku polskim i angielskim (abstract) oraz spis pozycji piśmienniczych.

W trakcie zapoznawania się z pracą doktorską nasunęły mi się następujące uwagi / zapytania:

- Z jakiego źródła został pobrany materiał badawczy do zapoczątkowania kultur *in vitro*? W którym roku? Gatunek ten jest często mylony z innymi pokrewnymi taksonami z rodzaju *Salvia*, tak więc proszę o odpowiedź na pytanie kto dokonał identyfikacji gatunku i na jakiej podstawie? Czy okaz zielnikowy jest zdeponowany i posiada swój numer identyfikacyjny?
- Ze względu za rozległy zakres badań i zastosowanych metod badawczych oraz interdyscyplinarny charakter badań naturalnym jest ustalenie czy Doktorantka samodzielnie wykonywała wszystkie opisane w rozprawie doświadczenia / jeżeli nie wszystkie to w jakim zakresie i pod czyją opieką merytoryczną?
- Czy Doktorantka próbowała także hodować korzenie przybyszowe (nietransformowane)? Jeżeli tak, czy charakteryzowały się one niższym współczynnikiem przyrostu biomasy i akumulacją wybranych bioaktywnych

związków? Jaką przewagę w produkcji biomasy i metabolitów wtórnych mają korzenie transformowane nad korzeniami przybyszowymi?

- Jak należałoby wyjaśnić spostrzeżenie, że korzenie klonu C3 charakteryzowały się największą liczbą wytwarzanych korzeni bocznych a zarazem najslabszym wzrostem?
- Czy udałooby się odpowiedzieć Doktorantce na pytanie z jakim zjawiskiem można skorelować różnice w zabarwieniu korzeni transformowanych?
- Czy powszechnym zjawiskiem jest stosowanie bioreaktorów typu PlantForm oraz Rita do hodowli biomasy korzeniowej?
- Fotografia 14 – czy u podstawy pędów tworzył się kalus / zachodziła organogeneza pośrednia?
- Tabela 23 – dlaczego jednostką zastosowaną dla badanych ekstraktów jest mg a µg dla substancji referencyjnych?
- Zauważa Pani, że większość eksplantatów (pędów transformowanych) niezależnie od rodzaju i stężenia cytokininy w pożywce charakteryzowała się zbliżonym procentem odpowiedzi w postaci regeneracji pędów/pąków. Jak to jest w przypadku pędów nietransformowanych? Czy pędy transformowane i nietransformowane cechowały się podobną morfologią?
- W jaki sposób obliczała Pani współczynnik mnożenia pędów? Czy około 4-5 pędów potomnych to satysfakcjonująca wartość dla rośliny o tym typie wzrostu?
- Czy badano tożsamość genetyczną pędów potomnych mnożonych klonalnie?

WNIOSEK KOŃCOWY

W świetle wyżej przedstawionej, pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że zostały spełnione wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 187, ust. 1 i 2 ww. ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Na tej podstawie wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy oraz dopuszczenie mgr Marty Krzemińskiej do dalszych etapów postępowania dotyczącego nadania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Ponadto, wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr farm. Marty Anny Krzemińskiej pt. „Kultury transformowanych korzeni i pędów *Salvia bulleyana* Diels jako źródło bioaktywnych metabolitów” wykonanej pod promotorstwem dr hab. Izabeli Grzegorzczak-Karolak, prof. UM ze względu na duże walory naukowe rozprawy.

Małgorzata Kikowska.....

Dr hab. Małgorzata Kikowska