



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

KATEDRA BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII FARMACEUTYCZNEJ

ZAKŁAD BIOTECHNOLOGII FARMACEUTYCZNEJ

ul. Borowska 211

50-556 Wrocław

tel. 71 78404501

e-mail: sylwia.zielinska@umw.edu.pl

dr hab. Sylwia Zielińska, prof. uczelni

Wrocław, 21.05.2023

Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej

Zakład Biotechnologii Farmaceutycznej

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Marty Krzemińskiej

pod tytułem:

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

wykonanej pod kierunkiem naukowym promotora dr hab. n. farm. Izabeli Grzegorzczak-Karolak, prof. UM.

PROBLEMATYKA PODJĘTA W ROZPRAWIE

Recenzowana praca dotyczy badań nad uzyskaniem kultur transformowanych korzeni i pędów *Salvia bulleyana* Diels jako źródła bioaktywnych metabolitów wyspecjalizowanych. Na drodze eksperymentalnej Doktorantka dokonała optymalizacji warunków hodowli uzyskanych kultur korzeni i pędów transformowanych oraz zbadała właściwości antyoksydacyjne, cytotoksyczne i przeciwdrobnoustrojowe ekstraktów pozyskanych z obu typów kultur organów.

Materiałem przeznaczonym do badań były cztery klony korzeni transformowanych *Salvia bulleyana* (C1-C4) uzyskane w wyniku transformacji przy użyciu bakterii *Rhizobium rhizogenes* szczepu A4 oraz spontanicznie zregenerowane pędy wykształcające się na otrzymanych korzeniach. Po przeprowadzeniu analiz potwierdzających zajście procesu transformacji materiału roślinnego, Doktorantka zbadała jego profil fitochemiczny. W tym celu sporządziła wyciągi metanolowo-wodne z korzeni i pędów transformowanych, które zanalizowała z zastosowaniem ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas (UHPLC-PDA-ESI-MS). Spośród badanych kultur korzeni, Doktorantka wyselekcjonowała klon C4, jako charakteryzujący się najwyższą produktywnością w kierunku biosyntezy związków polifenolowych. Kolejno dokonała optymalizacji warunków hodowli tego materiału, suplementując podłoża hodowlane różnymi stężeniami witamin i sacharozy, a także manipulując warunkami oświetlenia. Po wyznaczeniu krzywej wzrostu celem ustalenia optymalnego terminu zbioru materiału roślinnego, Doktorantka zbadała wpływ elicytorów biotycznych i abiotycznych na produkcję związków polifenolowych w korzeniach transformowanych hodowanych w zoptymalizowanych warunkach.

Kolejno, autorka dysertacji wykonała serię zabiegów w celu ustalenia najlepszych warunków wzrostu biomasy oraz akumulacji związków polifenolowych w drugim badanym rodzaju materiału roślinnego, którym były pędy *S. bulleyana*, spontanicznie zregenerowane z kultur korzeni transformowanych. Posłużyła się technikami wzbogacania płynnego podłoża hodowlanego w egzogenne substancje wzrostowe z grupy cytokinin oraz zastosowała oświetlenie lampami fluorescencyjnymi w natężeniu PPF 40 $\mu\text{M}/\text{m}^2\cdot\text{s}$.

W celu zwiększenia skali hodowli korzeni i pędów transformowanych, materiał umieszczony został także w systemach okresowego zalewania podłożem płynnym, w tak zwanych bioreaktorach typu PlantForm i Rita.

Na ostatnim etapie prac, wyciągi metanolowo-wodne sporządzone z uzyskanego drogą biotechnologicznych zabiegów materiału roślinnego, Doktorantka poddała ocenie w kierunku zweryfikowania ich potencjalnych właściwości antyoksydacyjnych, cytotoksycznych i przeciwdrobnoustrojowych.

Z uwagi na potencjał leczniczy *S. bulleyana* związany z obecnością w surowcu cennych metabolitów wyspecjalizowanych takich jak związki polifenolowe (kwas kawowy, kwas rozmarynowy, kwasy salwianolowe i ich izomery) oraz tanszynony i wykorzystywanie tego gatunku rośliny w chińskiej medycynie ludowej, wybór gatunku do badań nad pozyskaniem surowca metodami biotechnologicznymi jest uzasadniony. Zabiegi prowadzące do otrzymania kultur roślinnych organów transformowanych umożliwiają pozyskiwanie wysokiej jakości surowca o ustabilizowanym profilu fitochemicznym, co jest ważne w kontekście badań nad otrzymywaniem biofarmaceutyków.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY

W dysertacji Pani Marty Krzemińskiej podjęte zostały wysiłki w celu poznania możliwości zastosowania zabiegów biotechnologicznych z zakresu transformacji materiału roślinnego z udziałem wektora bakteryjnego (*Rhizobium rhizogenes* szczepu A4) do pozyskania wysoko-produktywnego klonu korzeni i pędów transformowanych chińskiej rośliny leczniczej *Salvia bulleyana*.

Doktorantka wybrała za cel swoich badań gatunek rośliny znany w Tradycyjnej Chińskiej Medycynie i stosowany zamiennie jako jeden z około 20 gatunków bogatych w tanszynony i kwasy fenolowe, znanych pod wspólną nazwą surowca „*Danshen*”, posiadającego swoją monografię w Farmakopei Chińskiej Republiki Ludowej.

W części teoretycznej rozprawy Doktorantka dokonała charakterystyki botanicznej wybranego do badań gatunku rośliny. Nakreśliła także rys historyczny zastosowania farmakopealnego surowca *Danshen*, czyli wysuszonych i sproszkowanych korzeni oraz kłączy szałwii czerwonokorzeniowej (*S. miltiorrhiza*), a także zwróciła uwagę na wciąż aktualną sprzedaż korzeni lokalnie występujących spokrewnionych gatunków szałwii jako powyższego surowca. Wśród nich znajduje się także, analizowana w przedstawionej do recenzji dysertacji, *S. bulleyana*.

Wybór gatunku do badań wydaje się uzasadniony z uwagi na dostępne dane świadczące o zastosowaniu surowca *Danshen* w leczeniu wielu różnych dolegliwości, w tym ze strony układu krążenia, dusznicy bolesnej, a także jako środka skutecznego do zwalczania stanów zapalnych i marskości wątroby oraz przy bolesnym miesiączkowaniu i w bezsenności. Ponadto, pierwszy

chiński ziołowy lek, stosowany w leczeniu choroby niedokrwiennej serca i dusznicy bolesnej, który przeszedł trzecią fazę badań klinicznych i uzyskał aprobatę amerykańskiej Agencji Żywności i Leków, bazuje na recepturze *Danshen*.

W dalszej części teoretycznej pracy, Doktorantka wyczerpująco przedstawiła dane literaturowe na temat struktury, szlaków biosyntezy oraz właściwości biologicznych i zastosowania związków polifenolowych (kwas kawowy, kwas rozmarynowy, kwasy salwianolowe, flawonoidów - głównie pochodnych luteoliny i fenyloetanoloidów), a także diterpenów (tanszynon IIA, kryptotanszynon) i kwasów organicznych, obficie produkowanych zarówno w częściach nadziemnych jak i korzeniach *S. bulleyana*.

Właściwe tło dla podjętych w części doświadczalnej eksperymentów, stanowi także obszerny opis metod pozyskiwania materiału roślinnego, obfitującego w metabolity wyspecjalizowane, różnymi technikami biotechnologicznymi w warunkach hodowli w szkle. W tej części pracy Doktorantka przedstawiła obszernie zagadnienia poświęcone transformacji metodami bezwektorowymi i wektorowymi głównie z udziałem dwóch popularnie stosowanych gatunków bakterii glebowych, czyli *Rhizobium rhizogenes* oraz *Agrobacterium radiobacter*, choć w przypadku tego drugiego gatunku, autorka w pracy posługuje się uprzednio stosowaną nomenklaturą, tzn. *A. tumefaciens*.

Doktorantka stosuje w pracy określenie „transformacja genetyczna” w odniesieniu do modyfikacji zachodzących po wprowadzeniu do organizmu roślinnego dzikich szczepów *R. rhizogenes* oraz *A. tumefaciens*, co w świetle aktualnego stanu wiedzy powinno być terminem zarezerwowanym dla modyfikacji dokonywanych przy wprowadzaniu do organizmu gospodarza tzw. konstruktywów genowych i tym samym uzyskiwaniu organizmów modyfikowanych genetycznie.

Opis metodyki pracy, odnoszący się do wszystkich przeprowadzonych eksperymentów i analiz, został przedstawiony w bardzo staranny i przejrzysty sposób.

W części eksperymentalnej pracy Doktorantka podjęła trud uzyskania kultur organów transformowanych i ich hodowli w celu pozyskania surowca bogatego w kwasy fenolowe takie jak pochodne kwasu kawowego, głównie kwas rozmarynowy i kwasy salwianolowe. Spośród czterech pierwotnie uzyskanych klonów korzeni, po potwierdzeniu procesu transformacji, Doktorantka wybrała jeden klon, który okazał się być najefektywniejszym pod względem przyrostu biomasy i produkcji metabolitów wyspecjalizowanych. Dodatkowym materiałem do

badan stały się kultury pędów pozyskane na drodze spontanicznej regeneracji tych organów na dwóch klonach korzeni transformowanych (C7 i C9). Warto podkreślić, że w badaniu mającym na celu potwierdzenie transformacji zarówno w przypadku korzeni jak i pędów, do reakcji PCR Doktorantka użyła aż sześciu genów, tzn. *aux1*, *aux2*, *rolB*, *rolC*, *rolD* oraz *virG*. Fragmenty DNA odpowiadające bakteryjnym genom *aux2*, *rolB* i *rolD* znalazła we wszystkich liniach korzeni. Natomiast żadnego z wyżej wymienionych genów nie wykryto w korzeniach nietransformowanych pochodzących z roślin macierzystych hodowanych w glebie. W przypadku klonu P7 pędów transformowanych zidentyfikowano fragmenty odpowiadające bakteryjnym genom *rolB* oraz *rolC* i żadnego z nich w kulturze kontrolnej. Wyniki te świadczą o dobrze przygotowanym warsztacie weryfikującym podjęte eksperymenty.

Analizy fitochemiczne wyciągów sporządzonych z kultur organów transformowanych, przeprowadzone zostały z zastosowaniem ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas (UHPLC-PDA-ESI-MS) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Do przeprowadzenia analiz jakościowych i ilościowych, Doktorantka wykorzystwała cechy spektralne badanych związków oraz odpowiednie substancje referencyjne, a uzyskane wyniki odnosiła do danych zebranych z dostępnej literatury. Lista zidentyfikowanych związków została przedstawiona w Tabeli 2. w sposób zwięzły i przejrzysty, choć nagłówek ostatniej kolumny w/w tabeli nie do końca odpowiada jej zawartości. Znajdują się w niej bowiem dane dotyczące charakterystycznych fragmentów rozpadu w jonizacji ujemnej, a nie „piki odpowiadające jonom fragmentacyjnym” jak głosi nagłówek. Z kolei, w przypadku analiz ilościowych, autorka pracy nie sprecyzowała z ilu punktów pomiarowych wyznaczone zostały krzywe kalibracyjne dla poszczególnych substancji.

W eksperymentach mających na celu optymalizację warunków hodowli wybranego klonu korzeni transformowanych, Doktorantka wykorzystwała cztery rutynowo stosowane w warunkach prowadzenia kultur *in vitro* składy podłoży hodowlanych z pełną lub obniżoną do połowy zawartością mikro- i makroelementów. Były to podłoża takie jak Woody-Plant (WP), wg Schenk'a i Hildebrandt'a (SH), wg Murashige-Skoog'a (MS) oraz wg Gamborga (B5). Dodatkowo, autorka pracy zadała sobie trud zweryfikowania wpływu zawartości witamin i stężenia cukru w podłożu hodowlanym oraz wpływ rodzaju światła na wzrost kultur i produkcję związków polifenolowych w wyselekcjonowanym klonie korzeni. Opis parametrów wzrostu kultur korzeni został

przedstawiony w pracy z najwyższą starannością. Autorka pracy odnosi się do szczegółów budowy morfologicznej badanych organów, każdorazowo dołączając rzetelnie przygotowaną fotodokumentację i odnosząc się do ich profilu metabolicznego wraz z podaniem zawartości związków dominujących. Na podstawie obszernych badań porównawczych popartych analizą statystyczną TOPSIS, Doktorantka dokonała wyboru najlepszego wariantu podłoża hodowlanego, tzn. SH z obniżoną do połowy zawartością mikro- i makroelementów oraz witamin. Selekcja podłoża hodowlanego była wykonana pod kątem przyrostu biomasy jak również produkcji związków polifenolowych, w profilu których zdecydowanie dominował kwas rozmarynowy.

Testując wpływ światła zarówno na rozwój kultur korzeni jak i spontanicznie zregenerowanych pędów, Doktorantka wykorzystwała świetlówki LED emitujące światło białe (390-760 nm), niebieskie (430 nm), czerwone (670 nm) oraz mieszane (70% światła czerwonego i 30% światła niebieskiego). W pędach hodowanych w różnych warunkach światła oznaczona została zawartość barwników asymilacyjnych oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych takich jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza oraz peroksydaza ponadtlenkowa, a także zawartość białka. W wyniku eksperymentów, Doktorantka dowiodła, że hodowla korzeni transformowanych na świetle, niezależnie od jego rodzaju była mniej korzystna niż w ciemności, zarówno pod względem uzyskanej biomasy jak i akumulacji metabolitów wyspecjalizowanych. W przypadku pędów, światło białe typu LED wpływało najkorzystniej na przyrost biomasy, natomiast aktywność enzymów antyoksydacyjnych pobudzona była również w pozostałych warunkach oświetlenia. Z kolei najwyższą zawartość związków polifenolowych Doktorantka odnotowała na świetle mieszanym.

W dalszych etapach pracy, Pani Marta Krzemińska sprawdziła wpływ egzogennych regulatorów wzrostu i rozwoju roślin na parametry mikrorozmnażania pędów transformowanych. W tym celu zastosowała jedno wybrane stężenie (0,1 mg/l) jednej wybranej auksyny, którą był kwas indoli-3-octowy w kombinacji z trzema różnymi substancjami z grupy cytokinin, tzn. rybozydem 6-benzyloaminopuryny, meta-topolinem i N-benzylo-9-(2-tetrahydropiranylo)-adeniną w trzech stężeniach (0,5, 1,0 lub 2,0 mg/l). Eksperymenty z udziałem wybranych regulatorów wzrostu i rozwoju roślin prowadziła tylko w warunkach światła białego LED. Tu rodzi się pytanie, czy zasadnym byłoby podjęcie eksperymentów porównawczych z udziałem pozostałych trzech rodzajów światła stosowanych w przedstawionych eksperymentach?

Doktorantka przetestowała także różne możliwości hodowli pędów na podłożach płynnych. W tym celu zastosowała tzw. „podpory” dla pędów transformowanych, hodowanych w słoikach i kolbach Erlenmeyera oraz hodowała pędy w systemach bioreaktorowych typu Rita i PlantForm.

W związku z niejednoznaczną odpowiedzią morfogenetyczną pędów, podobnie jak w przypadku kultur korzeni, przy doborze najbardziej optymalnego podłoża dla wzrostu kultur i produkcji związków polifenolowych, Doktorantka wykorzystwała analizę statystyczną TOPSIS dokładając dodatkowy parametr, którym był współczynnik namnażania. Dzięki takiemu podejściu metodycznemu, Doktorantce udało się dobrać układ eksperymentalny tak, aby osiągnąć najwyższe współczynniki mnożenia klonalnego materiału roślinnego o możliwie największej zawartości metabolitów wyspecjalizowanych.

Oprócz ustalenia warunków hodowli i po wyznaczeniu krzywej wzrostu, zbadany został także wpływ elicytorów biotycznych i abiotycznych na produkcję związków polifenolowych w kulturach korzeni transformowanych. Do tego celu Doktorantka zastosowała różne stężenia ekstraktów drożdżowych, kadmu w postaci soli chlorkowej, oraz etanolowych roztworów jasmonianu metylu i *trans*-anetolu. W wyniku badań, Doktorantka dowiodła, że najsilniejsze działanie stymulujące produkcję polifenoli w korzeniach transformowanych *S. bulleyana* miał ester metylowy kwasu jasmonowego w stężeniu 100 μ M. Wszystkie pozostałe elicytory zastosowane w pracy wybiórczo wzmacły produkcję niektórych związków polifenolowych, jednak nie były to wartości znaczące.

Hodowle korzeni transformowanych także prowadzono na podłożach płynnych w kolbach na wstrząsarkach, a także w systemach bioreaktorowych typu Rita oraz PlantForm okresowo zalewanych podłożem hodowlanym. Porównując produkcję związków polifenolowych w korzeniach hodowanych w tych systemach, najwyższe wartości osiągnięte zostały w przypadku korzeni z naczyń typu Rita i czasie zalewania podłożem przez 3 min co 1,5 h. Kultury hodowane w ten sposób wytwarzały od 34% do 67% więcej związków polifenolowych w porównaniu do korzeni hodowanych w pozostałych warunkach.

Korzenie i pędy transformowane pochodzące z hodowli o zoptymalizowanych warunkach zarówno dla przyrostu biomasy i produkcji związków polifenolowych zostały zbadane pod kątem ich potencjalnej aktywności przeciwutleniającej. Doktorantka zbadła zdolność ekstraktów do

„zmiatania” wolnych rodników przy zastosowaniu testów DPPH, ABTS oraz $O_2^{\bullet-}$, zbadła także zdolność do redukcji jonów żelaza testem FRAP, a także zdolność do zahamowania peroksydacji lipidów metodą TBARS. Doktorantka zaobserwowała pozytywną zależność między ilością związków polifenolowych w ekstraktach z korzeni, a ich aktywnością przeciwutleniającą. Dla porównania zbadła także ekstrakty z pędów transformowanych, które wykazały dużo słabszy potencjał w tym kierunku bioaktywności.

Ekstrakty uzyskane z kultur korzeni transformowanych pochodzących z najkorzystniejszych warunków hodowli z dodatkiem jasmonianu metylu zostały poddane testom pod kątem ich potencjalnych właściwości cytotoksycznych *in vitro*. Testy przeprowadzono na czterech liniach komórkowych takich jak linia ludzkich komórek nowotworowych szyjki macicy – HeLa, linia ludzkich komórek nowotworowych żołądka – AGS, linia ludzkich komórek gruczolakoraka okrężnicy – LoVo oraz referencyjna linia mysich fibroblastów – L929, która jest wymagana wg norm ISO 109935. Doktorantka zaobserwowała działanie cytotoksyczne ekstraktu z korzeni względem wszystkich wykorzystanych w doświadczeniu linii komórkowych, a siła tego działania zależała od stężenia ekstraktu i użytej linii. Jednocześnie, ekstrakt nawet w najwyższym badanym stężeniu (5 mg/ml) nie powodował istotnego spadku żywotności komórek linii L929 w porównaniu z kontrolą, co wskazało na bezpieczeństwo stosowania ekstraktu w testowanym zakresie stężeń.

W pracy przedstawione zostały także wyniki dotyczące badania właściwości przeciwdrobnoustrojowych uzyskanych ekstraktów z korzeni. Doktorantka wyznaczyła minimalne stężenie hamujące – MIC, minimalne stężenie bakteriobójcze – MBC i minimalne stężenie grzybobójcze – MFC dla szczepów bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus* ATCC 29,213 i *S. epidermidis* ATCC 12,228), Gram-ujemnych (*Escherichia coli* ATCC 29,212 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27,853), oraz grzybów (*Candida albicans* ATCC 10,231 i *Candida glabrata* ATCC). Ekstrakt z korzeni wykazywał umiarkowane działanie przeciwdrobnoustrojowe. Najsilniejszą aktywność przeciwbakteryjną Doktorantka zaobserwowała wobec bakterii Gram+, w szczególności wobec szczepu *S. epidermidis*, w porównaniu do bakterii Gram- oraz grzybów.

Wszystkie istotne wyniki badań zostały przedyskutowane przez Doktorantkę, w sposób krytyczny w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy. W tej części rozprawy, Pani Marta Krzemińska dla pełnego zobrazowania uzyskanych przez siebie danych na temat produkcji głównych metabolitów wyspecjalizowanych i aktywności biologicznej ekstraktów z transformowanych organów *S. bulleyana*, przytacza przykłady dostępnych wyników opublikowanych dla pokrewnych roślin w obrębie grup taksonomicznych takich jak rodzaj i rodzina. Z kolei porównując wyniki z zakresu ekspresji genów bakteryjnych, obecnych w organach roślinnych po transformacji i ich znaczenia w biosyntezie związków biologicznie aktywnych oraz z zakresu odpowiedzi morfogenetycznej kultur na zadane warunki hodowli, Autorka odnosi się do dostępnych informacji, także dla odleglejszych filogenetycznie gatunków roślin.

We wnioskach wysnutych na podstawie uzyskanych wyników, Doktorantka stwierdziła, że zastosowane zabiegi eksperymentalne pozwoliły uzyskać transformowany materiał roślinny o niemal dwukrotnie większej zawartości związków polifenolowych, w szczególności kwasu rozmarynowego w porównaniu do kultur korzeni przed optymalizacją warunków hodowli, a także od 5 do 13-razy większe od tych, raportowanych dla korzeni dwuletnich roślin matecznych rosnących w glebie. Inną istotną informacją wypływającą z badań w przedstawionej do recenzji pracy, wydaje się też obiecujący potencjał cytotoksyczny ekstraktu, sporządzonego z wysoko produktywnego klonu korzeni transformowanych, względem wszystkich stosowanych w doświadczeniach linii komórek nowotworowych. Zatem, surowiec ten ma szansę znaleźć zastosowanie w profilaktyce i terapii chorób cywilizacyjnych, ale czy w obliczu przedstawionych rezultatów badań można uznać gatunek *S. bulleyana* za potencjalny substytut *Danshen*, jak to jest praktykowane?

Podsumowując, warto podkreślić, że praca doktorska Pani mgr farm. Marty Krzemińskiej jest obszernym i wyczerpującym opracowaniem technik pozyskiwania transformowanego materiału klonalnego z gatunku *S. bulleyana*, bogatego w związki polifenolowe. Protokoły mnożenia klonalnego oraz otrzymania organów transformowanych wraz z oceną profilu fitochemicznego surowca zostały przedstawione do publicznej wiadomości w formie trzech oryginalnych artykułów. Były to pierwsze doniesienia naukowe na temat biotechnologicznego pozyskiwania surowca z tego gatunku rośliny.

OPIS FORMALNY ROZPRAWY

Przedłożona do recenzji rozprawa Pani mgr farm. Marty Krzemińskiej została napisana w układzie typowym dla rozpraw doktorskich. Obejmuje ona 240 stron, na których Doktorantka w przejrzysty sposób nakreśliła tło teoretyczne dla podjętych w części eksperymentalnej zadań badawczych. Metodyka pracy została przedstawiona w sposób nie budzący zastrzeżeń, a wyniki opisane w sposób zrozumiały. Dyskusja na temat uzyskanych wyników ma układ strukturalny, w którym Doktorantka w sposób uporządkowany odnosi się do aktualnego stanu wiedzy z zakresu poszczególnych zagadnień poruszonych w dysertacji.

Rozprawa podzielona jest na dziesięć rozdziałów takich jak *Skróty stosowane w pracy, Wstęp, Cel pracy, Materiały i metodyka, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Bibliografia, Wykaz publikacji i komunikatów zjazdowych*.

Poruszane zagadnienia i wyniki badań przedstawione są w formie 23 tabel, 62 wykresów, 6 rycin i 17 fotografii.

Bibliografia obejmuje 317 pozycji literaturowych uwzględniając publikacje, które ukazały się w krajowych i zagranicznych czasopismach naukowych w ciągu ostatnich lat, jak też monografie naukowe i pozycje podręcznikowe.

Cel pracy został jasno sformułowany i rozbity na osiem celów szczegółowych obejmujących zagadnienia dotyczące zabiegów biotechnologicznych w celu pozyskania kultur organów transformowanych, ocenę zawartości metabolitów w materiale roślinnym, optymalizację procesu przyrostu biomasy i produkcji związków polifenolowych w kulturach korzeni i pędów transformowanych, a także ocenę potencjału bioaktywności wyciągów metanolowo-wodnych sporządzonych z otrzymanego materiału roślinnego w warunkach *in vitro*.

Postępy prac eksperymentalnych są przedstawione a licznych fotografiach, co znacznie wzbogaca pracę i obrazuje stan uzyskanego surowca.

Uwagi krytyczne:

W pracy brak wykazu tabel, wykresów, rycin i fotografii.

Na chromatogramie obrazującym rozdział związków polifenolowych (rycina 6), pik oznaczony numerem 4 odpowiadający kwasowi rozmarynowemu, nie jest w pełni widoczny w porównaniu z pozostałymi pikami zaprezentowanymi na tym samym chromatogramie. Z dużym prawdopodobieństwem, próbka poddana analizie HPLC nie została dostatecznie rozcieńczona, aby pik odpowiadający temu związkowi mógł być widoczny w całości. Można przyjąć, że stało się za sprawą tego, iż w analizowanym ekstrakcie była duża dysproporcja w zawartościach pomiędzy poszczególnymi związkami polifenolowymi, ujawnionymi w rozdziale chromatograficznym.

Na wykresach 1-18, 21-52 brakuje oznaczenia danych na osi „y” – odpowiednia informacja znajduje się jedynie w opisach pod wykresami. Na pozostałych wykresach obie osie opisane są w sposób niebudzący zastrzeżeń.

W spisie skrótów brak wyjaśnienia skrótu „POD” odpowiadającemu jednemu z opisywanych enzymów.

W podrozdziale zatytułowanym „Biotechnologia roślin” brakuje odniesień do literatury.

Na stronie 39 znajduje się określenie „redyferencjacji” zamiast „dedyferencjacja”.

W pracy napotkać można nieliczne błędy edytorskie typu: na stronie 20 brak spacji między spójnikiem „i” a wyrazem „alternatywnymi”.

W pracy brakuje informacji na temat autorstwa wszystkich zamieszczonych fotografii.

WNOSKI KOŃCOWE

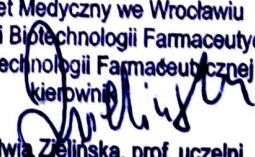
Podsumowując stwierdzam, że założone cele w pracy zostały w pełni zrealizowane. Rozprawa doktorska Pani Marty Krzemińskiej odnosi się do bardzo ważnych aspektów pozyskiwania najwyższej jakości surowca farmaceutycznego. Autorka pracy zapewniła wzorowy warsztat badawczy poprzez właściwy dobór metod analitycznych, które pozwoliły na otrzymanie wielu ciekawych wyników, opracowanie ich i wysnucie wniosków. Przedstawiona do recenzji rozprawa

doktorska Pani Marty Krzemińskiej stanowi cenny wkład w dotychczas zgromadzoną wiedzę z zakresu badań nad gatunkiem *Salvia bulleyana*.

Potwierdzeniem wysokiej wartości naukowej wyników zaprezentowanych w rozprawie są trzy oryginalne artykuły Doktorantki opublikowane w latach 2020-2022 w czasopismach *Journal of Biotechnology*, *Molecules* i *International Journal of Molecular Sciences* o wysokich współczynnikach wpływu i wysokiej punktacji ministerialnej. Należy podkreślić, że w dwóch spośród trzech prac, Doktorantka jest pierwszym autorem. Dodatkowo wyniki były również upowszechniane w formie ośmiu krajowych doniesień zjazdowych. Ponadto Pani Marta Krzemińska może się poszczycić pięcioma innymi publikacjami naukowymi (3 prace oryginalne i 2 przeglądowe) spoza zakresu badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej.

Wymienione powyżej uwagi krytyczne i edytorskie nie wpływają na wysoką ocenę przedstawionej do recenzji dysertacji.

W mojej opinii rozprawa Pani mgr farm. Marty Krzemińskiej spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ww. Ustawy stawiane rozprawom doktorskim niniejszym składam do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Marty Krzemińskiej.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej
Zakład Biotechnologii Farmaceutycznej
kierownik

dr hab. Sylwia Zielińska, prof. uczelni