



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD KOSMETOLOGII PRAKTYCZNEJ I PROFILAKTYKI CHOROÓB SKÓRY

PRACOWNIA BIOLOGII FARMACEUTYCZNEJ I BIOTECHNOLOGII

Collegium Pharmaceuticum
ul. Rokietnicka, 60-806 Poznań

e-mail: kikowska@ump.edu.pl
tel. 506135359

Poznań, 17.11.2022 r.

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora nauk farmaceutycznych

zatytułowanej „Zmienność profilu terpenoidów i fenylpropanoidów w kulturach
in vitro azjatyckiej rośliny leczniczej *Salvia yangii*”

wykonanej przez mgr inż. Weronikę Kozłowską

w Katedrze Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej, Zakładzie Biotechnologii
Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

pod kierunkiem dr hab. Sylwii Zielińskiej, prof. UMW

Niniejszą recenzję przygotowano w odpowiedzi na pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, prof. dra hab. Adama Matkowskiego, z dnia 02.11.2022 roku, informujące o powołaniu na recenzenta w przewodzie doktorskim Pani mgr inż. Weroniki Kozłowskiej, asystentki w Zakładzie Biotechnologii Farmaceutycznej Katedry Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Pani mgr inż. Weronika Kozłowska od 13 lat jest związana z jednostką, w której wykonywała badania naukowe. Doskonalenie warsztatu badawczego w zakresie technik kultur *in vitro* i analiz chromatograficznych oraz ukończenie studiów magisterskich na kierunku Biotechnologia oraz Farmacja renomowanych polskich uczelni wyższych pozwoliło na sprawne podjęcie ambitnych badań objętych niniejszą rozprawą doktorską. Imponujący dorobek naukowy Pani mgr inż. Kozłowskiej obejmuje 12 oryginalnych artykułów naukowych o sumarycznej wartości IF = 54,813 i punktacji MEiN równej 1245,00. O dużej aktywności naukowej Doktorantki świadczy też wydanie 1 artykułu w czasopiśmie bez IF, 3 rozdziałów w monografiach naukowych oraz 27 komunikatów

zjazdowych, w tym 18 międzynarodowych. Na uznanie zasługuje otrzymanie zespołowych, ale przede wszystkim indywidualnych, nagród Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu za ważne i twórcze dokonania naukowe w latach 2019-2021. Doktorantka nie tylko sprawnie działa na polu naukowym ale także angażuje się w działalność dydaktyczną, popularyzującą naukę i organizacyjną z ramienia swojej Katedry m.in. prowadząc zajęcia ćwiczeniowe obowiązkowe i fakultatywne dla studentów, będąc opiekunką Studenckiego Koła Naukowego, współorganizatorką Dolnośląskiego Festiwalu Nauki oraz pozyskując fundusze na badania, doposażenie laboratoriów i opracowanie nowych technik badawczych.

OCENA MERYTORYCZNA

Celem badań opisanych w niniejszej rozprawie przedłożonej na stopień doktora nauk farmaceutycznych było określenie wpływu światła o różnym natężeniu i spektrum oraz temperatury na skład i zawartość składników frakcji lotnej i nielotnych metabolitów terpenoidowych i fenylopropanoidowych hodowanych *in vitro* pędów *Salvia yangii*, azjatyckiej rośliny leczniczej. Obiekt badań stanowił takson wykorzystywany do leczenia wielu dolegliwości nękających społeczności zamieszkujące teren pokrywający się z obszarem występowania jednej z najstarszych cywilizacji – Persji. Nieliczne dane etnobotaniczne wskazują na zastosowanie głównie nadziemnych części roślin, liści i kwiatów, w leczeniu bólu brzucha, wymiotach, zatruciach pokarmowych, problemach oddechowych czy w celu obniżenia poziomu cukru we krwi (wywar stosowany doustnie), alergii skórnych, bólach stawowych, ukąszeniach pszczoł (okłady, kąpiele, opary stosowane zewnętrznie). Cenne właściwości prozdrowotne roślina zawdzięcza obecności bioaktywnych związków, głównie mono- i seskwiterpenoidów (lotnych pochodnych), diterpenoidów z dominującym kwasem karnozynowym i triterpenoidów takich jak kwas oleanowy i ursolowy oraz pochodnych fenylopropanoidowych, głównie kwasu rozmarynowego. Mimo, iż gatunek ten wcześniej był już wprowadzony do warunków *in vitro* a biomasa stanowiła obiekt badań biotechnologicznych i fitochemicznych, Doktorantka zaplanowała oryginalne badania eksperymentalne dotyczące wpływu czynników fizycznych, takich jak światło i temperatura, na morfogenezę i profil metaboliczny biomasy pędowej *S. yangii* hodowanej w kontrolowanych warunkach *in vitro*. Badania te uzupełniają dotychczasową wiedzę na temat możliwości produkcji biomasy tego cennego gatunku metodami biotechnologicznymi jako alternatywnego źródła bioaktywnych związków odpowiadających za wielkokierunkowe działanie tego surowca.

Uzyskane wyniki wskazują na dużą zmienność w składzie lotnych pochodnych mono- i seskwiterpenoidów oraz nielotnych pochodnych diterpenowych a także pochodnej fenylopropanoidowej – kwasu rozmarynowego w biomacie pędowej z kultur *in vitro* *S. yangii*. Stwarza

to możliwości manipulacji w składzie interesujących metabolitów charakterystycznych dla gatunku pod wpływem łatwych, dostępnych i uzasadnionych ekonomicznie technik biotechnologicznych. Narzędzie jakim jest manipulacja spektrum światła daje możliwości wpływu na zwiększenie cennych związków o interesującej aktywności. Z kolei wykazanie braku korelacji między poziomami transkrypcji genów syntazy cineolowej oraz SyCPS i SyCYP76AH3 a zawartością produktów, wskazujący na bardziej złożony mechanizm biosyntezy badanych związków, stanowi podwaliny do kontynuowania tej ciekawej tematyki w przyszłości. Jak podkreśla Doktorantka, uzyskane wyniki przyczyniają się do zrozumienia plastyczności fitochemicznej *Salvia yangi*, rośliny aromatycznej i leczniczej, w warunkach stresu środowiskowego.

Strona formalna pracy nie budzi zastrzeżeń. Praca napisana jest poprawnym językiem naukowym bez błędów stylistycznych i gramatycznych. Zarówno część teoretyczna jak i doświadczalna opisane zostały w sposób zrozumiały dla odbiorcy. Nieliczne uchybienia stylistyczne (np. brak kursywy w zapisie nazw łacińskich) i błędy literowe (np. HLPC zamiast HPLC) nie wpływają na wysoką jakość pracy.

OCENA METODOLOGICZNA

Spis pozycji piśmienniczych zawiera 131 pozycji. Zdecydowana większość (około 90 %) to anglojęzyczne artykuły naukowe renomowanych czasopism z listy filadelfijskiej. Ponad 60 % pozycji piśmienniczych została opublikowana w ostatniej dekadzie, co świadczy o ich aktualności. Dobór źródeł oceniam jako poprawny. Doktoranta w sposób właściwy wykorzystuje zebrane pozycje piśmiennicze i udowadnia swoje przygotowanie merytoryczne do prowadzenia badań oraz umiejętność przedyskutowania własnych wyników badań na tle istniejącej wiedzy.

Doktoranta nakreśla cel pracy adekwatny do problemu badawczego oraz realizowanych zadań badawczych dotyczących badań z zakresu biotechnologii roślin z zastosowaniem metod roślinnych kultur *in vitro*, biologii molekularnej z wykorzystaniem technik analizy genomu oraz metabolomu z aplikacją metod chromatograficznych. Właściwie sformułowane zadania badawcze realizuje poprzez adekwatny dobór metod badawczych i statystycznych. Mimo jasno zaznaczonego celu pracy i szczegółowych zadań badawczych, w sposób klarowny nie postawiono hipotezy badawczej.

W niniejszej pracy Doktorantka wykazała się znajomością metod hodowli pędów w warunkach *in vitro* oraz zaprojektowania eksperymentu z zastosowaniem zróżnicowanych warunków oświetleniowych o zmiennym natężeniu i spektrum światła - określiła parametry stanu fizjologicznego pędów z wykorzystaniem technik szacowania i) zawartości barwników fotosyntetycznych, ii) stopnia peroksydacji lipidów, iii) zdolności przeciwutleniających metodą

z rodnikiem DPPH*. W analizach fitochemicznych biomasy pędowej zastosowała metodę i) wykorzystującą odczynnik Folina-Ciocalteu określając całkowitą zawartość związków polifenolowych, ii) chromatografii cienkowarstwowej w celu stwierdzenia obecności związków triterpenowych, iii) chromatografii cieczowej (HPLC) w celu potwierdzenia obecności związków triterpenowych, iii) ponadto wykonała analizę jakościową i ilościową związków nielotnych metodą UHPLC-UV-Vis i metodą UHPLC-OTOF-MS oraz iv) analizę związków lotnych metodą chromatografii gazowej GC-MS. Dodatkowo warsztat pracy poszerzyła o metody biologii molekularnej badające poziom ekspresji poszczególnych genów. Pani Magister właściwie przedstawiła sekwencję działań badawczych.

Układ pracy doktorskiej jest prawidłowy. Praca zawiera część teoretyczną, rozpoczynającą się wstępem i celem badań a następnie podstawy teoretyczne wprowadzające do podejmowanej w pracy tematyki z zakresu źródeł światła używanych w hodowli roślin, biosyntezy terpenoidów i fenylopropanoidów, bioaktywnych związków obecnych w badanym gatunku, roślinnych kultur *in vitro* oraz charakterystyki botanicznej, zastosowania leczniczego i charakterystyki fitochemicznej *Salvia yangii*. W części doświadczalnej przedstawiony został badany materiał roślinny, metodyka z zakresu określania parametrów stanu fizjologicznego hodowanych pędów, analiz fitochemicznych, oznaczenia poziomu ekspresji wybranych szlaków biosyntezy oraz analizy statystycznej a w dalszej kolejności wyniki wraz z dyskusją wyników, podsumowanie oraz wnioski. W pracy znajduje się spis pozycji piśmienniczych, streszczenie w języku polskim i angielskim (abstract), wykaz stosowanych skrótów oraz wykaz fotografii, rycin, diagramów i tabel.

WNIOSEK KOŃCOWY

Podsumowując ocenę rozprawy Pani mgr inż. Weroniki Kozłowskiej stwierdzam, że tematyka badań jest oryginalna i cechuje ją interdyscyplinarny charakter. Wyniki badań w znacznym stopniu poszerzają wiedzę o badanym, dotąd słabo poznanym gatunku, ale oprócz waloru poznawczego mogą mieć także charakter aplikacyjny.

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

1. Jakie były warunki hodowli kultur pędowych tego gatunku szalwii na pożywkach stałych w systemie stacjonarnym? Czy Doktorantka wyselekcjonowała zaproponowany system spośród innych możliwych przeznaczonych do hodowli *in vitro* organów? Czy w pożywkach hodowlanych zastosowano regulatory wzrostu i rozwoju roślin?

2. Na jakiej podstawie dokonano wyboru optymalnego czasu wzrostu pędów w przypadku doświadczenia dotyczącego wpływu natężenia światła/temperatury oraz doświadczenia dotyczącego wpływu spektrum światła?
3. W pracy zauważyć można zastosowanie wielu technik chromatograficznych, czy Doktorantka samodzielnie wykonywała wszystkie oznaczenia jakościowe i ilościowe badanych związków? Jeżeli taką wiedzę i doświadczenie Doktorantka zdobywała stopniowo podczas 13-letniego stażu pracy, walory te czynią z niej eksperta w zakresie technik chromatograficznych.
4. Proszę o uzasadnienie wyboru metody z rodnikiem DPPH w celu określenia właściwości przeciwutleniających badanych próbek.
5. W badaniach nie zauważono jednoznacznej korelacji pomiędzy otrzymanymi ilościami związków a poziomem ekspresji genów. W jaki sposób Doktorantka zmodyfikowałaby metodologię badań lub uzupełniła badania w kolejne analizy celem dostarczenia wyjaśnienia mechanizmu produkcji wybranych metabolitów wtórnych pod wpływem zastosowanych czynników fizycznych?

Powyższe pytania nie umniejszają wartości recenzowanej pracy – biorąc pod uwagę doświadczenie naukowe Doktorantki, bardzo dobrą znajomość stosowanych technik oraz wysoki poziom publikowanych artykułów, zakładam że Autorka pracy doktorskiej udzieli merytorycznych odpowiedzi na powyższe pytania.

W świetle wyżej przedstawionej, pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że zostały spełnione wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim, zawarte w art. 13, ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789 ze zm.). Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy oraz dopuszczenie mgr Weroniki Kozłowskiej do dalszych etapów postępowania dotyczącego nadania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.


Dr hab. Małgorzata Kikowska