

**Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej  
Wydział Farmaceutyczny  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
Al. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk**

**Dr hab. Justyna Stefanowicz-Hajduk**

Gdańsk, 12. 11. 2022

**Ocena pracy doktorskiej  
mgr Weroniki Kozłowskiej  
pt. „Zmienność profilu terpenoidów i fenylopropanoidów  
w kulturach *in vitro* azjatyckiej rośliny leczniczej *Salvia yangii*”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Weroniki Kozłowskiej, wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Sylwii Zielińskiej, prof. UMW w Katedrze Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej, Zakładzie Biotechnologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, jest obszernym opracowaniem dotyczącym biotechnologicznych aspektów kultur *in vitro* gatunku *Salvia yangii*.

Roślinne kultury *in vitro* są istotną częścią biotechnologii i dowodzą, że zamiast kosztownego dostosowywania warunków środowiska, można uzyskiwać oczekiwane rezultaty m.in. dla fitoterapii, w sposób wygodniejszy i tańszy. Wychodząc z tego założenia Promotor i Autorka rozprawy doktorskiej postawiły sobie niełatwe zadanie mające na celu określenie wpływu różnych źródeł światła i temperatury na produkcję lotnych pochodnych terpenowych, nielotnych pochodnych diterpenowych oraz pochodnych fenylopropanoidowych w kulturach *in vitro* *Salvia yangii*.

Tekst ocenianej pracy doktorskiej obejmuje wymagane części tj. część teoretyczną, sprecyzowane cele, część eksperymentalną, wyniki i dyskusję, wnioski,

spis literatury, wykaz stosowanych skrótów oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Lektura 110 stronicowej, wielowątkowej pracy przekonuje, że przed rozpoczęciem badań, mgr Weronika Kozłowska należycie poznała złożoność problematyki jakiej dotyczyły. Znalazło to swoje odbicie w rozdziałach wstępnych rozprawy oraz piśmiennictwie, obejmującym 131 pozycji, w większości przypadków dotyczących badań wykonanych po 2010 roku.

**W części teoretycznej,** Autorka przedstawiła charakterystykę badanego gatunku rośliny, zarówno botaniczną, jak i fitochemiczną, opisując szczegółowo metabolity wtórne występujące w *Salvia yangii* B. T. Drew. Gatunek ten należy do rodziny *Lamiaceae* i znany jest również pod nazwą *Perovskia atriplicifolia* Benth. Obszar naturalnego występowania *Salvia yangii* obejmuje kraje centralnej i wschodniej Azji, takie jak Pakistan, Afganistan, Turkmenistan, Iran, północno-zachodnie Indie oraz Tybet. Na tych terenach *Salvia yangii* jest szeroko wykorzystywana w leczeniu wielu dolegliwości. W lecznictwie używa się głównie nadziemnych części rośliny – liści i kwiatów, a wywar z nich sporządzony jest stosowany doustnie głównie w bólach brzucha, wymiotach, czy zatruciach pokarmowych. Zewnętrznie natomiast w leczeniu alergii skórnych, bólach stawowych, czy ukąszeniach pszczoł. Za działanie farmakologiczne badanego gatunku rośliny niewątpliwie są odpowiedzialne główne metabolity wtórne rośliny. Autorka rozprawy skupiła się na trzech grupach metabolitów – lotnych pochodnych terpenowych – mono- i sekwiterpenach, diterpenach (w tym na kwasie karnozowym) oraz pochodnych fenylopropanoidowych (w tym na kwasie rozmarynowym), przedstawiając szczegółowo ich strukturę chemiczną oraz opisaną do tej pory w literaturze ich zawartość w *Salvia yangii*, zarówno w roślinach pochodzących z uprawy polowej, jak i kultur *in vitro*. Ponadto, w tej części rozprawy Autorka opisała w interesujący sposób właściwości biologiczne *Salvia yangii*, w tym aktywność przeciwbakteryjną, przeciwwirusową, czy też cytotoksyczną.

W części teoretycznej Autorka wyjaśniła również podstawy teoretyczne dotyczące roślinnych szlaków transdukcji sygnału, w tym roli receptorów światła oraz zastosowania różnych źródeł światła w uprawie i hodowli roślin. Doktorantka szczegółowo przedstawiła tu także szlaki biosyntezy terpenoidów i fenylopropanoidów. Natomiast pewien niedosyt informacyjny dla czytelników może pozostawiać zbyt krótki opis związany z ogólnymi zasadami prowadzenia kultur roślinnych *in vitro*.

W świetle przedstawionych informacji, Doktorantka w swojej pracy zajęła się istotną tematyką dotyczącą zbadania plastyczności fitochemicznej *Salvia yangii* hodowanej *in vitro* na skutek reakcji rośliny na różne natężenia i spektra światła oraz podwyższoną temperaturę, a także czas prowadzenia hodowli pod względem zawartości i profilu składników frakcji lotnej oraz nielotnych metabolitów terpenoidowych i fenylopropanoidowych. Autorka realizując główny cel założyła:

- ✓ określenie profilu związków terpenoidowych i fenylopropanoidowych w zadanych warunkach hodowli ze szczególnym uwzględnieniem lotnych pochodnych terpenoidowych, nielotnych pochodnych diterpenowych, nielotnych pochodnych fenylopropanoidowych;
- ✓ określenie wpływu warunków hodowli na poziom ekspresji genów kluczowych enzymów szlaków biosyntezy wybranych metabolitów wyspecjalizowanych;
- ✓ określenie korelacji poziomu ekspresji genów z zawartością wybranych pochodnych terpenoidowych i fenylopropanoidowych.

Ponadto, Doktorantka zaplanowała określenie wpływu światła o różnym natężeniu i spektrum emisji oraz temperatury na profil metaboliczny i morfogenezę *Salvia yangii* hodowanej *in vitro*, w tym także w wyniku długotrwałej hodowli w zadanych warunkach oraz określenie warunków hodowli sprzyjających biosyntezie wybranych metabolitów wyspecjalizowanych.

Przedstawione cele wskazują na szeroki zakres zaplanowanych badań.

Unikając przedstawiania streszczenia pracy i odnosząc się do **części eksperymentalnej**, mam następujące uwagi. Czy procedury ekstrakcji materiału roślinnego zostały wykonane na podstawie opisów metodycznych dostępnych w literaturze, czy też w wyniku optymalizacji własnej określonej metody? Ponadto, dlaczego pędy hodowane z użyciem różnych natężeń światła i temperatury były ekstrahowane w nieco odmienny sposób niż te inkubowane z różnymi rodzajami spektrum światła?

W części dotyczącej wyników Doktorantka zestawiała dużą liczbę danych dotyczących wpływu natężenia i spektrum światła oraz temperatury, a także długości prowadzenia hodowli na odpowiedź morfogenetyczną roślin hodowanych *in vitro*. Doktorantka wykazała znaczenie zastosowanych warunków na wzrost, stopień rozkrzewiania roślin, długość łodygi i wielkość blaszki liściowej. Natężenie i spektrum

światła w sposób zauważalny wpływały na morfologię hodowanych roślin. W przypadku roślin rosnących w różnych spektrach światła, długość czasu hodowli wynosił aż 54 tygodnie.

W tej części pracy doświadczalnej, Doktorantka przedstawiła obszerną analizę parametrów stanu fizjologicznego kultur pędów *Salvia yangii* w zależności od zastosowanych warunków hodowli, w tym zawartość barwników fotosyntetycznych – chlorofilu a, b i karotenoidów, zawartość produktów peroksydacji lipidów (TBARS) oraz stopień utleniania rodnika DPPH. Autorka stwierdziła, że zastosowane w badaniach warunki hodowli miały znaczny wpływ na zawartość barwników fotosyntetycznych w kulturach pędów. Światło LED miało największy udział w obserwowanej zmienności, natomiast temperatura, jako osobny czynnik, nie miała znaczącego wpływu na zawartość badanych barwników. Natomiast w połączeniu z natężeniem światła jej rola była istotna. W tej części opisu wyników, w Tab. 7 i 8 brakuje jednostki zawartości barwników fotosyntetycznych w pędach *Salvia yangii*, natomiast w tabeli 8 brak jest wskazania istotnych statystycznie różnic pomiędzy uzyskanymi wynikami.

W przypadku analiz zawartości produktów peroksydacji lipidów w badanych kulturach pędów, Doktorantka wykazała, że rodzaj światła ma istotny na nich wpływ. Ilości produktów peroksydacji lipidów były istotnie wyższe u roślin hodowanych z zastosowaniem świetlówek fluorescencyjnych w porównaniu z roślinami rosnącymi w świetle LED, ponadto zawartość tych produktów zależała od natężenia światła fluorescencyjnego. Z kolei temperatura i czas hodowli, jako odrębnie analizowane czynniki miały mniej istotne znaczenie na zawartość produktów peroksydacji lipidów. Doktorantka określiła również wpływ zastosowanych różnych natężeń światła fluorescencyjnego oraz temperatury na aktywność antyoksydacyjną pędów *Salvia yangii*. Na podstawie otrzymanych wyników, Autorka stwierdziła, że najsłabsze działanie antyrodnikowe zaobserwowano w przypadku materiału roślinnego pochodzącego z hodowli prowadzonych przy zastosowaniu 25°C, średniego natężenia światła i w 14 oraz 21 tygodniu hodowli. Z kolei w wyższej zastosowanej temperaturze aktywność ta była istotnie silniejsza. Tu mam pytanie do Doktorantki dotyczące wyjaśnienia użycia w prezentowanych wynikach wartości EC<sub>50</sub> zamiast IC<sub>50</sub>.

W części dotyczącej analiz fitochemicznych głównych metabolitów *Salvia yangii* w pełni uzasadniony jest wybór chromatografii cienkowsarstwowej (TLC), jak

również wysokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC-UV-VIS, UHPLC-QTOF-MS) jako metod badania nielotnych związków, a także chromatografii gazowej (GC-MS) w analizie związków lotnych *Salvia yangii*. W przypadku zawartości związków triterpenowych chromatografia TLC oraz HPLC nie wykazała obecności wykrywalnych ilości tych metabolitów w badanym surowcu. Nie ma tu jednak informacji jakie substancje referencyjne były użyte w analizie z użyciem TLC.

Na tym etapie badań, Doktorantka określiła również całkowitą zawartość związków fenolowych z zastosowaniem spektrofotometru.

Głównymi nielotnymi metabolitami badanymi przez Autorkę były kwas karnozowy i rozmarynowy. Doktorantka stwierdziła wpływ warunków hodowli na zawartość badanych związków, których ilość była generalnie znacznie wyższa w pędach hodowanych w świetle LED niż w świetle fluorescencyjnym. Temperatura, w przypadku eksperymentów ze światłem fluorescencyjnym i czas hodowli również wpływały na zawartość obu metabolitów w roślinach.

Analiza związków lotnych dotyczyła określenia zawartości węglowodorów monoterpenowych, tlenowych monoterpenów, acetylowanych monoterpenów, węglowodorów seskwiterpenowych i tlenowych seskwiterpenów. Autorka zidentyfikowała łącznie 20 związków lotnych w badanych pędach *Salvia yangii*. Na podstawie uzyskanych wyników, Doktorantka stwierdziła, że największy udział procentowy w pędach inkubowanych w świetle fluorescencyjnym miały tlenowe monoterpeny. W wyższej temperaturze (30°C) obserwowano zmianę proporcji między węglowodorami i tlenowymi pochodnymi w obrębie monoterpenów – w tych warunkach większy udział procentowy przypadał związkom zredukowanym, ale jedynie do 21 tygodnia hodowli. Podobnie w świetle LED, większość udziału przypadało utlenionym monoterpenom i węglowodorom seskwiterpenowym, a zawartość tych ostatnich, jak również acetylowanych monoterpenów zwiększała się w miarę upływu czasu hodowli. Z kolei w przypadku tlenowych seskwiterpenów dłuższa hodowla obniżała ich udział procentowy. Autorka przedstawiła również różniący się skład jakościowy związków lotnych w zależności od użytego rodzaju światła, co ma istotne znaczenie w przypadku doboru warunków hodowli *in vitro* celem uzyskania pożądanych metabolitów wtórnych.

Kolejnym etapem zaplanowanych przez Doktorantkę eksperymentów było określenie ekspresji genów kodujących enzymy wybranych szlaków biosyntezy metabolitów lotnych i nielotnych w pędach *Salvia yangii* hodowanych w świetle LED.

Dla związków nietlotnych analiza obejmowała geny kodujące enzymy ze szlaku kwasu karnozowego - SyCPS i SyCYP76AH3 oraz kwasu rozmarynowego - SyRAS. Natomiast w przypadku związków lotnych, Autorka określiła ekspresję genu dla enzymu z ostatniego etapu szlaku MEP – SyHDR, a także enzymów z początkowego etapu szlaku biosyntezy monoterpenu -SyGPPS i seskwiterpenów – SyFPPS oraz dla enzymów z końcowych etapów szlaku biosyntezy 1,8-cineolu (SyCinS) i kamfory (SyBDH). Doktorantka wskazała na to, że zarówno rodzaj użytego spektrum oraz czas hodowli mają wpływ na ekspresję poszczególnych genów. Autorka również podjęła próbę korelacji otrzymanych ilości transkryptu z ilością uzyskanych produktów.

Należy stwierdzić, że omawiana część doświadczalna pracy wymagała od Doktorantki opanowania szeregu zabiegów laboratoryjnych. Pani mgr Weronika Kozłowska wykonała dużą liczbę eksperymentów i uzyskała szereg wyników, co nie tylko świadczy o jej zaangażowaniu w prowadzeniu badań, lecz również wskazuje na nabycie przez Autorkę wielkiej wprawy w poczynaniach biotechnologicznych, związanych z osiągnięciem celu rozprawy. Podkreślić należy również bardzo dojrzałą dyskusję, jaką Autorka prowadziła w omawianiu otrzymanych wyników, wskazując na istotne czynniki wpływające na końcowe efekty prowadzonych badań.

Niewątpliwie, omawiając efekty pracy i sukcesy Doktorantki należy wymienić m.in. **określenie po raz pierwszy:**

- ✓ wpływu spektrum światła na biosyntezę kwasu karnozowego u *Salvia yangii*. Ta część eksperymentów stanowi oryginalny wkład w poznanie czynników regulujących produkcję tego ważnego antyoksydantu w roślinach;
- ✓ poziomu ekspresji genu SyCYP76AH3 ze szlaku metabolicznego kwasu karnozowego w pędach *Salvia yangii in vitro*;
- ✓ poziomu transkrypcji genów uczestniczących w biosyntezie lotnych pochodnych u *Salvia yangii*.

Doktorantka przedstawiła wnioski swojej rozprawy doktorskiej w rozdziale „Wnioski” w sześciu klarownie rozbudowanych punktach uwypuklających najistotniejsze i oryginalne osiągnięcia badań. Autorka wykazała zmienność profilu metabolicznego *Salvia yangii* w warunkach stresu środowiskowego, co niewątpliwie stanowi znaczące uzupełnienie wiedzy na temat plastyczności fitochemicznej

leczniczych roślin aromatycznych i ich adaptacji w trudnych warunkach. Tym samym Doktorantka w pełni zrealizowała zaplanowane cele badawcze.

W pracy brak jest większych potknięć redakcyjnych. W trakcie lektury pracy stwierdziłam tylko nieliczne błędy literowe i interpunkcyjne. Z obowiązku recenzenta zwracam jednakże uwagę na różną formę osobową przedstawiania swoich obserwacji – raz Doktorantka pisze np. „zauważyłam”, za drugim razem bezosobowo np. „zaobserwowano”. Ponadto, z innych potknięć, należy wymienić błędne oznaczenie w Tabeli 12 spektrum światła R+B oraz najdłuższego okresu trwania inkubacji. Pewien dyskomfort sprawia również podanie w niektórych miejscach części teoretycznej Wikipedii jako źródła informacji.

Oceniając stronę edytorską pracy chcę podkreślić staranność z jaką została przygotowana pełna dokumentacja w postaci: 4 fotografii, 14 rycin, 9 diagramów oraz 12 tabel.

Przedstawiona do oceny rozprawa świadczy o bardzo dobrym ogólnym przygotowaniu Autorki. Pani mgr Weronika Kozłowska w wysokim stopniu opanowała umiejętność krytycznej oceny wyników, wykazując się przy tym nie tylko dobrym zrozumieniem zagadnień teoretycznych, ale także doświadczeniem biotechnologicznym i analitycznym. W przypadku ocenianej pracy stwierdzam, że rozprawa mgr Weroniki Kozłowskiej spełnia wymagania stawiane pracom na stopień naukowy doktora i bardzo dobrze dokumentuje opanowany przez Doktorantkę warsztat naukowy, umożliwiający prowadzenie ważnych, poznawczych i aplikacyjnych badań obejmujących biotechnologię roślin i fitochemię.

### **Wnioski końcowe**

Recenzowaną pracę oceniam wysoko z uwagi na duże walory naukowe i użyteczne. Uzyskane wyniki mogą być bardzo pomocne w badaniach biotechnologicznych roślin. Będą stanowić również podstawę do podjęcia kolejnych projektów.

**W świetle wyżej przedstawionej, pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że zostały spełnione wymagania 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.

Gdański Uniwersytet Medyczny  
Wydział Farmaceutyczny  
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej  
80-416 Gdańsk, al. Gen. J. Hallera 107  
tel. 58 349 12 99 fax 58 349 12 39  
e-mail: pharmbot@gumed.edu.pl

dr hab. Justyna Stefanowicz-Hajduk  
12.11.2022