

**Recenzja pracy doktorskiej mgr farm. Anny Jesionek pt.
„Otrzymywanie olejku eterycznego o przewidywanej aktywności biologicznej
w kulturach *in vitro* *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*)”
przedstawiona Radzie Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
w celu uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych**

Promotorem pracy była Pani prof. dr hab. Maria Łuczkiwicz z Katedry i Zakładu Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych, ośrodka naukowego z dużym doświadczeniem w prowadzeniu badań fitochemicznych i biotechnologicznych.

Zadaniem badawczym postawionym w pracy doktorskiej było otrzymanie w kulturach *in vitro* biomas *R. tomentosum*, w których zachodziłaby w sposób stabilny i powtarzalny, synteza bogatego w terpeny olejku eterycznego o właściwościach przeciwzapalnych. Uzyskany materiał może być alternatywnym źródłem bagna zwyczajnego rosnącego na stanowiskach naturalnych. Gatunek nie był wcześniej przedmiotem badań biotechnologicznych, stąd w tym zakresie praca jest nowatorska. Nowością jest też opracowanie metod analizy składu olejku oraz wykazanie aktywności biologicznej olejku, dotąd nie badanej w zastosowanych modelach.

Podstawą pracy doktorskiej jest cykl, spójnych tematycznie dziewięciu prac naukowych opublikowanych w latach 2013 – 2019 w ośmiu w czasopismach z IF. Są to dwie prace o charakterze przeglądowym (*Fitoterapia* IF: 2,216 oraz *J Sci Food Agric* IF: 2,076), sześć oryginalnych prac eksperymentalnych (*Acta Biol Crac Ser Bot* IF: 0,491; *Plant Cell Tiss Org Cult* IF: 2,004; *J Chromatogr B* IF: 2,813; *Ind Crops Prod* IF: 4,191; *Acta Pol Pharm - Drug Res* IF: 0,447; *Fitoterapia* IF: 2,431), jedna popularnonaukowa nagrodzona w konkursie organizowanym przez „Forum Akademickie” oraz doniesienia prezentowane na sześciu zjazdach międzynarodowych. Praca doktorska została przygotowana w formie komentarza do opublikowanych prac naukowych. Dokumentacja składa się z następujących części: wprowadzenie, cel pracy, komentarz do otrzymanych wyników, kopie prac stanowiących podstawę pracy doktorskiej, oświadczenia mgr Jesionek oraz współautorów prac o udziale w badaniach, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis piśmiennictwa. Z oświadczeń autorki i współautorów wynika znaczący udział doktorantki w

wykonaniu publikacji. We wszystkich pracach z IF mgr Anna Jesionek jest pierwszym autorem a pracy popularnonaukowej jedynym autorem.

Osiem prac stanowiących podstawę rozprawie doktorskiej zostało opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR, ocenionych pod względem merytorycznym przez recenzentów z wielu ośrodków naukowych, działających niezależnie. Moim głównym zadaniem jako recenzenta, będzie ocena zakresu podjętej tematyki, spójności przeprowadzonych prac oraz zaopiniowanie nadesłanej dokumentacji szczególnie autorskiego komentarza i innych zawartych w niej części.

Cel i zakres pracy jest jasno sprecyzowany i uzasadniony. Założone zadania badawcze przewidywały wykonanie prac biotechnologicznych, fitochemicznych i ocenę aktywności biologicznej. Wybór gatunku *R. tomentosum* do badań, których celem było poszukiwanie frakcji/związków o spodziewanym działaniu biologicznym, w tym przypadku przeciwwzapalnym, jest uzasadniony stosowaniem tego surowca w medycynie tradycyjnej w chorobach reumatycznych. Aktywność biologiczna, w tym przeciwwzapalna i antyoksydacyjna była potwierdzona przez innych autorów we wcześniejszych pracach prowadzonych w innych modelach badawczych. Ze względu na częściową ochronę przyrody, którą objęty jest *R. tomentosum* oraz wpływ czynników środowiskowych na zróżnicowanie składu frakcji lotnych mgr Anna Jesionek otrzymała biomasy w warunkach *in vitro*, co może gwarantować uzyskanie olejku o powtarzalnym składzie i aktywności biologicznej.

Pracę zainicjowały dwie publikacje o charakterze przeglądowym, jedna obejmująca analizę danych literaturowych na temat *R. tomentosum*, stanowiska gatunku w systemie botanicznym, jego cech botanicznych, związków czynnych, aktywności biologicznej, tradycyjnego stosowania w medycynie różnych krajów a także w homeopatii i kosmetyce została opublikowana w ważnym międzynarodowym czasopiśmie z zakresu farmakognozji: „Fitoterapia”, druga praca dotyczyła właściwości i zastosowania herbat otrzymywanych z różnych gatunków *Rhododendron*. Prace stanowiły solidną podstawę do zaplanowania badań własnych i dyskusji otrzymanych wyników.

Analizując przebieg i wyniki rozprawy doktorskiej w zakresie biotechnologii stwierdzam, że Doktorantka wykazała się wiedzą, umiejętnością oraz pracowitością niezbędną w realizowaniu badań przy doświadczalnym doborze składu jakościowego i ilościowego podłoża, pożywek, fitohormonów oraz metod elicytacji, warunków doświadczenia. W efekcie uzyskała zróżnicowane kultury *in vitro* *R. tomentosum*, w których zachodziła produkcja aktywnych terpenów. Opracowanie warunków właściwych dla *R. tomentosum* wymagało wielu eksperymentów, gdyż były to pierwsze badania

biotechnologiczne tego gatunku. Doktorantka wykazała że możliwe jest przeniesienie do kultur płynnych, mikropędów namnażanych na podłożu stacjonarnym - agarowym syntetyzujących olejek, lecz o innym składzie niż roślina macierzysta. O znajomości zagadnień z zakresu biotechnologii świadczy opracowanie powtarzalnej metody otrzymania biomasy w warunkach płynnych kultur wytrząsanych, o wysokiej zawartości i szybkim wzroście ilości olejku eterycznego, w porównaniu z wieloletnią rośliną macierzystą. Zaproponowana metoda pozwala na otrzymanie w sposób ciągły znacznej ilości surowca do otrzymywania olejku bogatego w terpeny. Dowodem na sprawne posługiwanie się warsztatem badawczym jest opracowanie wieloetapowego protokołu mikrorozmnażania *R. tomentosum* (dobór podłoża, regulatorów wzrostu, selekcja eksplantatów) wraz z otrzymaniem sadzonek o cechach morfologicznych charakterystycznych dla wymienionego gatunku i ich aklimatyzacja w warunkach *ex vitro*. Stwarza to możliwość reintrodukcji gatunku do środowiska naturalnego. Mgr Anna Jesionek ponadto podjęła próby, zastosowania bakterii *Agrobacterium rhizogenes*, a także inicjowania lub zwiększania produkcji metabolitów w warunkach stresowych z udziałem elicytorów abiotycznych i biotycznych różnego pochodzenia, w tym po raz pierwszy mszyc. Próby te jednak nie zostały zakończone spodziewanym efektem.

Autorka dysertacji wykazała się również wiedzą i skutecznością w realizacji prac fitochemicznych. Rozpoczęła je od ustalenia warunków procesu izolacji, które zasadniczo wpływają na zawartość i skład olejku, czyli od określenia sposobu suszenia i od opracowania metody wydajnego otrzymania frakcji lotnej, której skład jakościowy i ilościowy byłby charakterystyczny dla wyjściowego materiału roślinnego. Mgr Jesionek wykazała się znajomością metod analizy olejku eterycznego oraz umiejętnością interpretacji uzyskanych wyników. Posłużyła się powszechnie stosowaną w analityce olejków metodą GC/MS, a także opracowaną przez siebie metodą rozdziału chromatograficznego olejku, którą wykorzystwała w opracowaniu analizy ilościowej HPTLC z densytometrią. Opracowana metoda ilościowa po jej walidacji okazała się użyteczna do szybkich badań skreeningowych składu i zawartości głównych składników olejków otrzymanych z biomas i porównanie profili metabolicznych olejków eterycznych bagna zwyczajnego zebranego z 54 różnych stanowisk w Europie i w Azji. Wykorzystując uzyskane wyniki zaproponowała wyodrębnienie dziesięciu chemotypów *R. tomentosum*, co stanowi istotny wkład w chemotaksonomię tego gatunku.

W ramach zaplanowanej oceny aktywności biologicznej udowodniła, że frakcje lotne powodując ograniczenie proliferacji limfocytów T przez wzrost ich apoptozy i przy wysokim stężeniu nekrozę synowiocydalnych fibroblastów, mogą wywierać efekt przeciwwzapalny. Co ważne, wykazano podobny profil działania wobec badanych komórek, frakcji lotnych z roślin

z gruntu i z kultur *in vitro*. Opracowana metoda chromatografii była przydatna do przeprowadzenia testów bioautografii TLC, które wskazywały na aktywność antyoksydacyjną olejków z kultur i ze stanowisk naturalnych oraz brak działania na oksydazę ksantynową. Wykazane przez mgr Jesionek działanie może częściowo wyjaśniać aktywność przeciwzapalną surowca.

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Anny Jesionek jest bardzo wartościowa nie tylko w aspekcie naukowo-poznawczym ale również aplikacyjnym. Doktorantka zrealizowała wyczerpująco, w większości z pozytywnym efektem, prawidłowo zaplanowane, wielokierunkowe założenia badawcze zawarte w celu pracy. Sposób realizacji części biotechnologicznej pracy świadczy o dobrej znajomości różnych technik *in vitro*. Procedura wykonania części fitochemicznej jest dowodem na opanowanie przez mgr Annę Jesionek szeregu metod fitochemicznych, które posłużyły jako narzędzie do analizy składu i zawartości olejków eterycznych w materiale roślinnym. Do badań wdrożono metody pozwalające na ocenę aktywności biologicznej antyoksydacyjnej oraz przeciwzapalnej. Realizacja pracy w założonym zakresie nie byłaby możliwa bez dobrej znajomości najnowszego piśmiennictwa. Zakres pracy i sposób jej realizacji wskazuje na dojrzałe podejście, umiejętność zaplanowania, dobre opanowanie warsztatu badawczego, determinację i skuteczność w wykonywaniu badań z zakresu biotechnologii, fitochemii i oceny aktywności biologicznej.

Uzyskane w ramach pracy doktorskiej wyniki wnoszą istotny wkład do wiedzy dotyczącej prowadzenia kultur *in vitro* *R. tomentosum*, z których można uzyskać biomasy bogate w olejek eteryczny, poznania składu frakcji lotnej i wstępnej oceny właściwości biologicznych. Badania w tym zakresie były wykonywane po raz pierwszy.

Praca jest zwięzła, zrozumiała, zredagowana wyjątkowo starannie. Manuskrypt jest atrakcyjny pod względem edytorskim.

O wysokiej randze naukowej recenzowanej pracy świadczy opublikowanie wyników badań w czasopismach naukowych ze wskaźnikiem IF (łącznie IF: 16.669).

Praca była realizowana w ramach grantu PRELUDIUM 8 przyznanego przez NCN, projektu III Osi priorytetowej współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, a także ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego przyznanego dla Wydziału Farmaceutycznego GUM.

Oceniam, że recenzowana praca prezentuje wysoki poziom naukowy, spełnia a nawet przewyższa, ustawowe wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora nauk

farmaceutycznych. Wnioskuje zatem do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Anny Jesionek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoki poziom przeprowadzonych badań, ich duży zakres i wartość aplikacyjną, oraz opublikowanie jako pierwszy autor, wyników prac w czasopismach naukowych o łącznym IF=16,669, wnioskuje do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie ocenianej pracy.

Wierstawa Byłus

Prof. dr hab. Wiesława Byłka

Poznań, 23 maja 2020 r.

Emerytowany profesor Katedry i Zakładu Farmakognozji

Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Imię i nazwisko doktoranta: **mgr farm. Anna Jesionek**

Tytuł pracy doktorskiej: **Otrzymywanie olejku eterycznego o przewidywanej aktywności biologicznej w kulturach *in vitro* *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*)**

WNIOSEK O WYRÓZNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Niniejszym zwracam się do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej.

UZASADNIENIE

Stwierdzam, że recenzowana praca prezentuje wysoki poziom naukowy, spełnia a nawet przewyższa ustawowe wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora nauk farmaceutycznych. Wyniki pracy zostały przedstawione w ośmiu spójnych tematycznie pracach naukowych, opublikowanych w czasopismach o łącznym współczynniku oddziaływania IF=16,669, dwie prace mają charakter przeglądowy (IF=4,292), sześć prac zawiera wyniki eksperymentów (IF= 12, 377).

We wszystkich pracach mgr Anna Jesionek jest pierwszym autorem.

Praca jest wartościowa nie tylko w aspekcie naukowo-poznawczym ale też aplikacyjnym. Założone cele badawcze z zakresu biotechnologii, fitochemii oraz badań biologicznych zostały w sposób wyczerpujący zrealizowane.

Uzyskane w ramach pracy doktorskiej wyniki wnoszą istotny wkład do wiedzy dotyczącej prowadzenia kultur *in vitro* *R. tomentosum*, z których można uzyskać biomasy bogate w olejek eteryczny, poznania składu frakcji lotnej i wstępnej oceny właściwości biologicznych. Badania w tym zakresie były wykonywane po raz pierwszy.

Dokumentacja rozprawy została zredagowana wyjątkowo starannie.

Wiesława Byłka