



Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr farm. Anny Jesionek

pt.: "Otrzymywanie olejku eterycznego, o przewidywanej aktywności biologicznej,
w kulturach *in vitro* *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*)"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. farm. Marii Łuczkiwicz.

Na uwagę zasługuje fakt, że praca powstała w wyniku realizacji grantu badawczego przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu PRELUDIUM 8 (nr 2014/15/N/NZ7/03027). „Ponadto, Autorka niniejszej pracy została objęta wsparciem w ramach projektu dofinansowanego w III Osi priorytetowej „Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju”, Działanie 3.2 Studia doktoranckie, Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego (POWR.03.02.00-00-1026/17-00 – Power 2)”.

Obiektem badań recenzowanej rozprawy doktorskiej jest *Rhododendron tomentosum* Harmaja, dawniej *Ledum palustre* L. - bagno zwyczajne z rodziny Ericaceae (wrzosowate). Jest to zimozielony krzew rosnący w Europie, Azji i Ameryce Północnej. W Polsce gatunek ten jest zagrożony wyginięciem ze względu na osuszanie jego naturalnych siedlisk i dlatego objęty jest częściową ochroną na podstawie „Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin”. Bagno zwyczajne nie dostarcza substancji ani przetworów farmakopealnych, ale jest rośliną leczniczą od wieków stosowaną w medycynie ludowej w leczeniu chorób płuc, infekcji bakteryjnych oraz schorzeń reumatycznych. Wyniki współczesnych badań bagna zwyczajnego, wskazują na istotną rolę zespołu związków terpenowych wytwarzanych przez ten gatunek, w leczeniu stanu zapalnego i towarzyszącego mu bólu.

Rozprawa doktorska mgr Anny Jesionek stanowi spójny tematycznie zbiór ośmiu artykułów opublikowanych w recenzowanych anglojęzycznych czasopismach naukowych i opatrzone: wprowadzeniem, celem pracy, komentarzem do uzyskanych wyników, wnioskami, piśmiennictwem oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Ta część pracy napisana jest pięknym językiem polskim i jest bardzo dobrze przygotowana pod względem edytorskim. Praca zawiera również oświadczenia współautorów publikacji, łącznie z którymi liczy 206 stron.

Dorobek naukowy Doktorantki jest imponujący. Publikacje wchodzące w zakres rozprawy ukazały się w przedziale lat 2015-2020 w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, takich

jak: *Journal of the Science of Food and Agriculture; Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica; Plant Cell and Tissue Organ Culture; Journal of Chromatography B; Industrial Crops & Products; Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research; Fitoterapia*. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Całkowity współczynnik oddziaływania (IF) publikacji wynosi **16,669**, a liczba punktów **MNiSW – 320**.

Wśród 8 publikacji stanowiących podstawę rozprawy, dwie prace są przeglądowe:

1. Dampc, A., Łuczkiwicz, M. (2013) *Rhododendron tomentosum (Ledum palustre)*: a review of traditional use based on current research. *Fitoterapia*, 85: 130-143. *IF: 2.216*, punkty *MNiSW: 25*.
2. Dampc, A., Łuczkiwicz, M. (2015) Labrador tea: the aromatic beverage and spice: a review of origin, processing and safety. *J Sci Food Agric*, 95: 1577-1583. *IF: 2.076*, punkty *MNiSW: 35*.

oraz sześć prac to oryginalne publikacje doświadczalne:

1. Jesionek, A., Kokotkiewicz, A., Włodarska, P., Filipowicz, N., Bogdan, A., Ochocka, R., Szreniawa-Sztajnert, A., Zabiegała, B., Buciński, A., Łuczkiwicz, M. (2016) *In vitro* propagation of *Rhododendron tomentosum*: an endangered essential oil bearing plant from peatland. *Acta Biol Crac Ser Bot*, 58: 29-43. *IF: 0.491*, punkty *MNiSW: 15*.
2. Jesionek, A., Kokotkiewicz, A., Włodarska, P., Zabiegała, B., Buciński, A., Łuczkiwicz, M. (2017) Bioreactor shoot cultures of *Rhododendron tomentosum (Ledum palustre)* for a large-scale production of bioactive volatile compounds. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 131: 51-64. *IF: 2.004*, punkty *MNiSW: 35*.
3. Jesionek, A., Pobłocka-Olech, L., Zabiegała, B., Buciński, A., Krauze-Baranowska, M., Łuczkiwicz, M. (2018) Validated HPTLC method for determination of ledol and alloaromadendrene in the essential oil fractions of *Rhododendron tomentosum* plants and *in vitro* cultures and bioautography for their activity screening. *J Chromatogr B*, 1086: 63-72. *IF: 2.813*, punkty *MNiSW: 30*.
4. Jesionek, A., Kokotkiewicz, A., Królicka, A., Zabiegała, B., Łuczkiwicz, M. (2018) Elicitation strategies for the improvement of essential oil content in *Rhododendron tomentosum (Ledum palustre)* bioreactor-grown microshoots. *Ind Crops Prod*, 123: 461-469. *IF: 4.191*, punkty *MNiSW: 40*.
5. Jesionek, A., Zabiegała, B., Buciński, A., Łuczkiwicz, M. (2019) From harvesting to distillation – effect of analytical procedures on the yield and chemical composition of *Rhododendron tomentosum (Ledum palustre)* essential oil. *Acta Pol Pharm – Drug Res*, 76: 83-92. *IF: 0.447*, punkty *MNiSW: 40*.
6. Jesionek, A., Kokotkiewicz, A., Mikosik-Roczyńska, A., Ciesielska-Figlon, K., Łuczkiwicz, P., Buciński, A., Dac, A., Witkowski, J.M., Bryl, E., Zabiegała, B., Łuczkiwicz, M. (2019) Chemical variability of *Rhododendron tomentosum (Ledum palustre)* essential oils and their pro-apoptotic effect on lymphocytes and rheumatoid arthritis synoviocytes. *Fitoterapia*, 139: 104402. *IF: 2.431*, punkty *MNiSW: 100*.

Wyniki pracy doktorskiej prezentowane były także na sześciu zagranicznych konferencjach naukowych, 2 razy jako doniesienia ustne i 4 razy w formie plakatów.

Do rozprawy włączono dodatkowo pracę popularnonaukową z 2019 roku, wyłącznego autorstwa mgr Anny Jesionek, pt.: "Aromat bagna", opublikowaną w Forum Akademickim. Przedruk artykułu ukazał się w Gazecie GUMed [29 (7): 53-56]. Praca napisana jest w języku

polskim i zawiera dwa wątki. W jednym Autorka w bardzo ciekawy sposób przedstawia zastosowanie lecznicze i użytkowe *Ledum palustre* w czasach średniowiecza. W drugim Autorka wskazuje na ciągle aktualne znaczenie tego gatunku i roślin w lecznictwie oraz na znaczenie biotechnologii w badaniach i ulepszaniu roślin leczniczych. Artykuł ukazuje literackie zdolności Doktorantki. Ponadto zdobył on III nagrodę w XIV edycji konkursu „Skomplikowane i proste. Młodzi uczeni o swoich badaniach”, organizowanego przez miesięcznik „Forum Akademickie” pod honorowym patronatem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

W przypadku dwóch publikacji przeglądowych Doktorantka wykonała kwerendę literaturową, przeanalizowała zebrane dane oraz napisała manuskrypty. Prace te stanowią bogate kompendium wiedzy na temat *Rhododendron tomentosum*.

Pierwsza praca przeglądowa została opublikowana w czasopiśmie *Fitoterapia*. Wnosi ona wiele informacji oraz stanowi podsumowanie danych dotyczących taksonomii, botaniki, ekologii, składu chemicznego, aktywności biologicznej, toksykologii oraz tradycyjnego i współczesnego zastosowania *R. tomentosum*. Do tej publikacji, Doktorantka zebrała i przeanalizowała aż 152 publikacje naukowe z okresu ponad 50 lat.

Druga praca przeglądowa została opublikowana w czasopiśmie *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Stanowi ona przegląd 38 pozycji literaturowych i dotyczy pochodzenia, przetwarzania i bezpieczeństwa wytwarzanego w Ameryce Północnej napoju aromatycznego i przyprawy o nazwie „Labrador tea” zawierających suszone liście gatunków: *Rhododendron groenlandicum*, *R. tomentosum* lub *R. neoglandulosum*. Doktorantka zwraca w tej publikacji uwagę na konieczność badania składu chemicznego tego popularnego od stuleci produktu dietetycznego, ze względu na toksyczność obecnych w nim ledolu i grajnotosyn. Ponadto przegląd piśmiennictwa do tej publikacji, wskazał na duże zróżnicowanie składu chemicznego, pod względem ilościowym i jakościowym, w obrębie poszczególnych gatunków z rodzaju *Rhododendron* wchodzących w skład „Labrador tea”, zależne od regionu ich występowania, co komplikuje jednoznaczne określenie toksyczności tego produktu.

W przypadku sześciu oryginalnych publikacji eksperymentalnych udział Doktorantki był znaczący i dotyczył opracowania planu poszczególnych eksperymentów naukowych, przeprowadzenia badań biotechnologicznych, fitochemicznych i biologicznych, opracowania, analizy i interpretacji wyników oraz napisania manuskryptów.

Publikacje eksperymentalne stanowią spójną tematykę badawczą, której celem było otrzymanie stabilnego oraz niezależnego od warunków środowiskowych roślinnego systemu *in vitro* na bazie mikropędów *Rhododendron tomentosum*, zdolnego do ciągłego wytwarzania lotnych związków terpenowych o aktywności przeciwzapalnej i potencjalnym zastosowaniu w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS). Choroba ta powoduje degradację chrząstki i kości, co prowadzi do niesprawności układu ruchu, jak również do współistniejących zmian patologicznych mięśnia sercowego i płuc. Główny cel pracy Doktorantka realizowała w 3 uzupełniających się obszarach badawczych:

biotechnologicznym, fitochemicznym oraz biologicznym z założeniem, że wynik końcowy badań może mieć znaczenie aplikacyjne - może doprowadzić do opracowania roślinnego preparatu leczniczego stosowanego w RZS.

Uważam, że podjęty przez Doktorantkę cel badawczy i przeprowadzone badania są uzasadnione i niezmiernie ważne, gdyż w dobie narastającej liczby różnych chorób konieczne jest poszukiwanie nowych źródeł pozyskiwania farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych. Rośliny od wieków są cenione jako leki, wytwarzają metabolity wtórne o działaniu farmakologicznym, które są pierwowzorem dla leku syntetycznego. Często są to fizjologicznie silnie działające połączenia, które z chemicznego punktu widzenia mają tak skomplikowaną strukturę, że ich synteza chemiczna jest nieopłacalna. Ponadto eksperymenty biotechnologiczne zastosowane przez Doktorantkę dają możliwość intensyfikacji wytwarzania wtórnych metabolitów w roślinnych systemach *in vitro*. Rośliny lecznicze uzyskiwane w hodowli *in vitro*, z uwzględnieniem wysokowydajnych odmian roślin modyfikowanych pod względem metabolicznym, a także gatunków zagrożonych objętych ochroną, np.: badany *R. tomentosum*, czy kultury tkanek i organów roślinnych, z uwzględnieniem hodowli na większą skalę w bioreaktorach oraz korzenie i rośliny transgeniczne są cennym, a ciągle niedocenianym materiałem roślinnym dostarczającym metabolitów wtórnych.

W obszarze badań biotechnologicznych Doktorantka dokonała wielu osiągnięć. Po raz pierwszy wprowadziła *R. tomentosum* do kultur *in vitro*. Realizując etap *upstream* procesu biotechnologicznego, opracowała system roślinny o wysokiej wartości użytkowej (mikropędy *R. tomentosum*), prowadzony w bioreaktorze okresowo-zalewowym RITA®. Co istotne, uzyskany system roślinny charakteryzuje się wysoką produktywnością olejku eterycznego utrzymującą się na poziomie 0,36 ml/l/dzień i może stanowić alternatywne i niezależne od środowiska źródło pędów do pozyskiwania na skalę komercyjną lotnych związków terpenowych, interesujących pod względem farmakologicznym. Opracowano również kompletny protokół mikrorozmnażania *R. tomentosum*, który w Polsce jest gatunkiem zagrożonym wyginięciem. Protokół stwarza możliwość czynnej ochrony tego gatunku. Uzyskane wyniki eksperymentów biotechnologicznych poszerzyły stan wiedzy dotyczący biosyntezy olejków eterycznych w kulturach *in vitro*. Wykazały również, brak podatności *R. tomentosum* na agroinfekcję oraz oporność tego gatunku na indukcję ryzogenezy w badanych warunkach *in vitro*. Należy podkreślić, że wprowadzenie określonego gatunku rośliny do kultur *in vitro* jest dużym wyzwaniem. Wymaga przeprowadzenia wielu prac eksperymentalnych mających na celu optymalizację warunków do ciągłego i stabilnego wzrostu uzyskanej biomasy, ocenę zdolności biomasy do biosyntezy pożądaných metabolitów, przeprowadzenia różnych zabiegów biotechnologicznych intensyfikujących nie tylko przyrost biomasy, ale również wytwarzanie wtórnych metabolitów, jak np. stosowana przez Doktorantkę elicytacja kultur *R. tomentosum*. W celu zintensyfikowania wytwarzania lotnych terpenów Doktorantka przetestowała szerokie spektrum czynników elicytujących nieorganicznych, organicznych, pochodzenia bakteryjnego, grzybowego i stawonogowego.

Są to badania bardzo pracochłonne i czasochłonne. Doktorantka podołała temu wyzwaniu, a wszystkie uzyskane przez Nią wyniki badań biotechnologicznych przedstawione w trzech publikacjach są innowacyjne.

W obszarze badań fitochemicznych Doktorantka przeprowadziła analizę chemiczną olejków eterycznych pozyskanych z kultur *in vitro* oraz dla celów porównawczych, z roślin gruntowych *R. tomentosum*. Głównymi składnikami otrzymanych z mikropędów *R. tomentosum* frakcji lotnych był tlenek ledeu (II) (ok. 13%), szioibunon (ok. 8%), *p*-cymentol (ok. 7%) i alloaromadendren (ok. 6%). Natomiast w olejku eterycznym wyizolowanym z roślin zebranych ze stanu naturalnego (stanowiska pomorskie) dominował γ -terpineol (8,5% – 11,8%), występowały także ledol, palustrol i *p*-cymentol.

Istotnymi zadaniami poprzedzającymi analizę chemiczną zapewniającymi trwałość połączeń terpenowych było określenie optymalnych warunków suszenia surowca oraz ustalenie metody izolacji frakcji lotnej z biomas.

W analizie fitochemicznej Doktorantka stosowała nowoczesne i adekwatne do prowadzonych badań techniki analityczne. Opracowano metody chromatograficzne umożliwiające analizę jakościową i ilościową składu chemicznego olejków eterycznych pozyskanych z *R. tomentosum*, tj. chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC/MS) oraz wysokosprawną chromatografię cienkowarstwową (HPTLC). Za pomocą opracowanej i zwalidowanej metody HPTLC z detekcją densytometryczną przeprowadzono testy skryningowe materiału zebranego z różnych stanowisk naturalnych, oraz biomas *in vitro* w zakresie zawartości wybranych związków terpenowych o przewidywanej aktywności przeciwzapalnej. Wspomniana powyżej metoda jest nowatorska i ma potencjał aplikacyjny w badaniach skryningowych w analizie środowiskowej, monitorowaniu procesów biotechnologicznych oraz w bezpośredniej bioautografii.

Ważnym aspektem poznawczym pracy było określenie, za pomocą statystycznej analizy porównawczej, dziesięciu chemotypów *R. tomentosum* w obrębie populacji europejsko-azjatyckich. Charakteryzowały się one zmiennym składem chemicznym frakcji lotnych. Tym badaniem Doktorantka potwierdziła celowość realizowanych przez nią eksperymentów biotechnologicznych, które umożliwiają pozyskanie surowca roślinnego o stałej zawartości olejku eterycznego.

Uzupełnieniem badań biotechnologicznych i fitochemicznych *R. tomentosum* były badania biologiczne *in vitro*, wnoszące aspekt nowości. Doktorantka, za pomocą cytometrii przepływowej, oceniała aktywność proapoptotyczną frakcji lotnych pochodzących z roślin macierzystych i kultur *in vitro* *R. tomentosum*, wobec limfocytów T oraz synowocytów ludzkich. Badanie wykazało, że frakcje te ograniczają proliferację ww. komórek poprzez wzrost ich apoptozy, co potwierdza wysoki potencjał badanego zespołu połączeń terpenowych w terapii RZS. Natomiast bezpośrednia bioautografia metodą TLC, potwierdziła właściwości antyoksydacyjne badanych frakcji lotnych oraz wykluczyła udział inhibicji oksydazy ksantynowej w mechanizmie ograniczania stanu zapalnego.

Uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej wyniki badań znacząco poszerzyły aktualny stan wiedzy na temat:

1. Chemizmu *Rhododendron tomentosum*.
2. Potencjału metod biotechnologicznych w pozyskiwaniu unikatowego materiału roślinnego o znaczeniu terapeutycznym, na przykładzie mikropędów *Rhododendron tomentosum*, które wytwarzają na stałym i wysokim poziomie związki terpenowe.
3. Przydatności olejków eterycznych pochodzących z roślin gruntowych i z mikropędów *Rhododendron tomentosum* w leczeniu RZS.

Nie mam pytań do Doktorantki dotyczących tematyki badawczej rozprawy ponieważ jest ona tak dobrze przedstawiona pod względem merytorycznym, że w trakcie czytania rozprawy znajdowałam w niej odpowiedzi na wszystkie nurtujące mnie pytania.

Podczas obrony chciałabym poprosić Panią mgr Annę Jesionek o przedyskutowanie następującego zagadnienia: przeprowadzone przez Panią badania biotechnologiczne stwarzają możliwość pozyskania surowca roślinnego o stałej zawartości olejku eterycznego, czy w związku z tym widzi Pani możliwość wykorzystania opracowanego przez Panią systemu mikropędów *R. tomentosum* do wytwarzania na skalę przemysłową związków terpenowych o znaczeniu terapeutycznym?

Reasumując, rozprawa doktorska Pani mgr farmacji Anny Jesionek zawiera elementy nowości naukowej, wnosi elementy poznawcze oraz jest bardzo dobrze zaplanowanym oryginalnym zagadnieniem naukowym. Tematyka pracy jest aktualna i istotna w obszarze badań biotechnologicznych, fitochemicznych oraz badań związków naturalnych o potencjale terapeutycznym w materiale roślinnym. Wskazuje na wszechstronną wiedzę teoretyczną Doktorantki w reprezentowanej dyscyplinie naukowej, umiejętność prowadzenia prac eksperymentalnych oraz właściwą ich interpretację.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Anny Jesionek pt. „Otrzymywanie olejku eterycznego, o przewidywanej aktywności biologicznej, w kulturach *in vitro* *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*)” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w Art. 13 Ustawy z dnia 27 września 2017 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2017 r., poz. 1789) oraz w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U. 2018 r., poz. 1668).

Przedstawiam zatem Radzie Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Pani mgr farmacji Anny Jesionek do dalszych etapów przewodu doktorskiego i składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.

KIEROWNIK
Zakładu Biologii Farmaceutycznej i
Biotechnologii Roślin Leczniczych

prof. dr hab. n. farm. Agnieszka Pietrosiuk

Warszawa, 22.06.2020 r.

Pieczętka jednostki organizacyjnej recenzenta

Agnieszka Pietrosiuk

Imię i nazwisko recenzenta

prof. dr hab. n. farm.

Tytuł/stopień naukowy/stanowisko recenzenta

Imię i nazwisko
doktoranta:

Anna Jesionek

Tytuł pracy doktorskiej:

Stosowanie oleju eterycznego, z przewidywanej
aktywności biologicznej, w kulturach in vitro
Rhododendron tomentosum (Ledum palustre)

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Niniejszy zwracam się z wnioskiem do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie:

Rozprawa doktorska Pani mgr farmacji Anny Jesionek zawiera elementy nowości naukowej, wnosi elementy poznawcze oraz jest bardzo dobrze zaplanowanym oryginalnym zagadnieniem naukowym. Tematyka pracy jest aktualna i istotna w obszarze badań biotechnologicznych, fitochemicznych oraz badań związków naturalnych o potencjale terapeutycznym w materiale roślinnym. Wskazuje na wszechstronną wiedzę teoretyczną Doktorantki w reprezentowanej dyscyplinie naukowej, umiejętność prowadzenia prac eksperymentalnych oraz właściwą ich interpretację.

Dorobek naukowy Doktorantki jest imponujący. Osiem publikacji wchodzących w zakres rozprawy ukazało się w przedziale lat 2015-2020 w anglojęzycznych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Całkowity współczynnik oddziaływania (IF) publikacji wynosi 16,669, a liczba punktów MNiSW – 320.

KIEROWNIK
Zakładu Biologii Farmaceutycznej i
Biotechnologii Roślin Leczniczych
Agnieszka Pietrosiuk
prof. dr hab. n. farm. Agnieszka Pietrosiuk

22.06.2020v.