

Recenzja rozprawy na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu,  
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne **mgr farm. Michała Pawła Malińskiego**  
pt. „**Kultury *in vitro* *Lychnis flos-cuculi* L. (*Caryophyllaceae*) jako potencjalne źródło  
metabolitów wtórnych o aktywności biologicznej**”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. B. Thiem (promotor) i Pani dr hab. M. Kikowskiej (promotor pomocniczy). Podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne jest spójny tematycznie **cykl pięciu** wieloautorskich publikacji (trzech oryginalnych i dwóch przeglądowych) opublikowanych w latach 2014-2021, w czasopiśmie znajdujących się na liście filadelfijskiej. Łączny współczynnik oddziaływania *Impact Factor* tych prac wynosi 12,934, co odpowiada punktacji MNiSW=325. Warto podkreślić, że w czterech publikacjach Pan mgr Michał P. Maliński jest pierwszym autorem, a w trzech z nich autorem korespondencyjnym. Doktorant złożył swoje oświadczenia, a także dołączył kopie oświadczeń Współautorów, z których wynika, że Jego wkład w ich powstanie był znaczący i wahał się w granicach 55%-80%. Polegał on m.in. na udziale w opracowaniu koncepcji prac, zbiorze materiału ze stanu naturalnego, przeprowadzeniu badań biotechnologicznych, izolacji ekdysteroidów, przygotowaniu próbek do analiz fitochemicznych i badań biologicznych, opracowaniu i interpretacji wyników, wykonaniu dokumentacji fotograficznej, i co najważniejsze opracowaniu i redakcji manuskryptu (publikacje P.1.-P.4.). Wyniki swoich badań Doktorant przedstawił także w postaci komunikatów zjazdowych na 13 konferencjach krajowych i 5 międzynarodowych. W skład dorobku naukowego Pana magistra wchodzi również jedna praca przeglądowa opublikowana w 2013 roku, w *Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (IF=0,633; MNiSW=15). Badania Doktoranta były finansowane z grantów Młodych Naukowców Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2014/2016 i 2018/2019.

**Ocena merytoryczna i metodologiczna rozprawy doktorskiej**

Recenzowana rozprawa ma formę autoreferatu zawierającego merytoryczny komentarz podsumowujący spójny tematycznie cykl publikacji wchodzących w skład rozprawy, który poprzedza

opis dorobku naukowego Doktoranta i Jego aktywność naukową oraz wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora. Doktorant uzasadnia szczegółowo wybór tematyki badań (str. 19-26), opisuje materiał i metody badawcze zastosowane w badaniach biotechnologicznych, fitochemicznych i aktywności biologicznej (str. 27-43), nakreśla cel pracy (str. 44), a także opisuje wyniki pracy doświadczalnej, odwołując się do publikacji wchodzących w cykl rozprawy (str. 45-62) oraz przedstawia podsumowanie opisujące najważniejsze wyniki (str. 62-65) i wyciąga wnioski końcowe w 9 punktach (str. 65-66). W części materiał i metody badawcze Doktorant w formie graficznej przedstawił schemat wyprowadzenia kultur *in vitro* *L. flos-cuculi* oraz izolacji dwóch ekdysteroidów. W pracy zamieszczono 6 Rycin i 3 Tabele. Ponadto, rozprawa doktorska zawiera słowa kluczowe, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz kopie wszystkich prac ujętych w cykl publikacji. Piśmiennictwo obejmuje 114 pozycji literaturowych (w tym 3 strony internetowe) odnoszących się do tematyki badań. Publikacje cytowane są poprawnie, choć w tekście rozprawy odnalazłam kilka nieścisłości tj. na str. 19 - Ratan i wsp. 2020, w spisie literatury jest rok 2021; str. 21 - Jürgens i wsp. 2004, w spisie literatury znajduje się pojedyncze nazwisko Jürgens; str. 22, 57, 58 - Biswas i Dwivedi 2019, w piśmiennictwie jest Dwivedi; str. 22 - Miguel-Chavez 2017, w spisie literatury jest Miguel-Chávez; str. 37 - Farmakopea Polska VI 2002, w wykazie publikacji jest "Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne. Farmakopea Polska VI, 2002. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne..."; str. 46 - APG IV, 2016, w wykazie publikacji jest "Angiosperm Phylogeny Group" oraz str. 60 - Ambrosio i wsp. 2020 - brak w spisie literatury roku publikacji. Praca jest napisana starannie i poprawnie pod względem formalno-językowym, choć Doktorant nie uniknął pojedynczych błędów edytorskich np. str. 21, 54, 57, 62 i 66.

Prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w czasopismach będących na liście filadelfijskiej tj. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, *Phytochemistry Reviews*, *Plants*, *Molecules* i *Revista Brasileira de Farmacognosia*, które już wcześniej poddane były krytycznej ocenie merytorycznej przez niezależnych recenzentów, dlatego też, w swojej recenzji odniosę się do oceny uzasadnienia wyboru tematyki badań przez Doktoranta, postawionych celów oraz ich realizacji.

We **wstępie** Doktorant rzeczowo przedstawił podjętą tematykę badań. Przedmiotem badań Pana mgr Michała P. Malińskiego była firletka poszarpana, *Lychnis flos-cuculi* L., rodzimy gatunek należący do rodziny Caryophyllaceae i występujący powszechnie w Eurazji, na wilgotnych glebach i słonecznych stanowiskach. Jednak, w ostatnich latach liczebność naturalnych stanowisk tego gatunku zaczęła maleć m.in. z powodu melioracji łąk związanej z osuszaniem podmokłych terenów, które są naturalnym siedliskiem firletki poszarpanej, celem wykorzystania ich pod uprawy rolne.

Zmiany klimatyczne tj. gorące i suche lata także przyczyniają się do wypierania tego gatunku z naturalnego jego ekosystemu. Ponadto, wczesne koszenie łąk powoduje, że rośliny nie przechodzą pełnego okresu wegetacji, nie kwitną i nie mogą zawiązać nasion, a tym samym się rozmnażać. Pozyskiwanie korzeni firletki poszarpanej z darni podmokłych łąk sprawia duże trudności, ponieważ korzenie czy kłącza innych gatunków mogą wrastać pomiędzy delikatne korzenie firletki, przez co są trudne do usunięcia i mogą zanieczyszczać surowiec. Firletka poszarpana stosowana była w lecznictwie tradycyjnym Europy, lecz skład chemiczny tego gatunku jest, jak dotąd, słabo poznany. Odwar z kwiatów *L. flos-cuculi* stosowano m.in. w bólach głowy, żołądka oraz malarii, a wyciągi z części nadziemnych używano do wspomaganie gojenia się ran. Ponadto, nadziemne części firletki poszarpanej wykazują m.in. działanie przeciwgrzybicze, przeciwbakteryjne i przeciwutleniające.

**Tło naukowe** uzasadniające wybór tematu i cel badań są jasno sprecyzowane i odpowiadają aktualnym potrzebom poszukiwania nowych substancji pochodzenia roślinnego. Jako **cel badań** Doktorant wyznaczył uzyskanie różnego typu kultur *in vitro* *L. flos-cuculi*, ocenę fitochemiczną ekstraktów z materiału pozyskanego z tych kultur, a także ocenę aktywności biologicznej tj. aktywność przeciwprzewodniakową, przeciwgrzybiczą i przeciwutleniającą wybranych ekstraktów.

Ponieważ *L. flos-cuculi* jest gatunkiem słabo poznany pod względem fitochemicznym i leczniczym oraz ze względu na pojawiające się trudności z jego występowaniem w środowisku naturalnym uważam, że temat podjęty przez Doktoranta jest aktualny i jak, najbardziej trafny i uzasadniony. W świecie roślin cały czas poszukuje się nowych źródeł substancji biologicznie czynnych, odkrywa gatunki o nieznanym, dotychczas, działaniu leczniczym, a przez poznanie ich składu chemicznego przyczynia się do wykorzystania ich cennych właściwości biologicznych.

Roślinne kultury *in vitro* mogą być alternatywą dla pozyskiwania materiału z naturalnych stanowisk czy też tradycyjnych upraw, szczególnie w przypadku gatunków roślin rzadkich, endemitów, czy roślin zagrożonych wyginięciem. Ponadto, zawartość metabolitów wtórnych jest niska w roślinach i zależy od wielu czynników, jak na przykład stadium rozwojowe rośliny, organ czy też warunki klimatyczne. Kultury *in vitro* są prowadzone w ściśle określonych, kontrolowanych warunkach, niezależnie od strefy klimatycznej, pory roku czy też warunków pogodowych. W stosunkowo krótkim czasie, w zależności od zastosowanej kultury, rodzaju podłoża hodowlanego, regulatorów wzrostu czy warunków hodowli można otrzymać znaczne ilości materiału roślinnego, który może być zastępczym źródłem pozyskiwania surowca. W związku z powyższym, cel badań Doktoranta uważam za jak najbardziej zasadny, a kultury *in vitro* *L. flos-cuculi* mogą być cennym źródłem biologicznie czynnych metabolitów wtórnych tj. saponin, ekdysteroidów, kwasów fenolowych czy też flawonoidów.

**Wyniki badań** Doktoranta, niewątpliwie, poszerzyły wiedzę w odniesieniu do słabo znanego pod względem chemicznym składu firletki poszarpanej, co jest istotne dla oceny potencjału

terapeutycznego tego gatunku. W publikacji P1. (*Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2014), Doktorant przedstawił systematykę, opis botaniczny, skład chemiczny, aktywność biologiczną *L. flos-cuculi*, a także wstępne doniesienia o kulturach *in vitro* tego gatunku. W innej pracy przeglądowej, publikacja P5. (*Phytochemistry Reviews*, 2017), stanowiącej cenne opracowanie merytoryczne, został przedstawiony przegląd aktualnej literatury opisującej wytwarzanie ekdysteroidów (głównych metabolitów występujących w *L. flos-cuculi*) przez roślinne kultury *in vitro* tj. kultury komórkowe oraz kultury organów gatunków roślin należących do różnych taksonów, a także sposoby zwiększania ich zawartości w kulturach *in vitro* poprzez różnego rodzaju zabiegi biotechnologiczne (dobór odpowiedniego podłoża hodowlanego, regulatorów wzrostu, stężenia sacharozy, temperatury, dodatek prekursorów biorących udział w szlaku biosyntezy ekdysteroidów czy też elicytację).

Kolejne trzy publikacje, publikacja P2. (*Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2019), P3. (*Plants*, 2021) i P4. (*Molecules*, 2021) są pracami eksperymentalnymi z ostatnich trzech lat, w których Doktorant **konsekwentnie realizował postawione cele**. Zastosowana metodyka badań, jak i interpretacja uzyskanych wyników jest poprawna, a liczba wykonanych doświadczeń i ich powtórzeń jest odpowiednia. Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Statistica 11 i 13. Ponadto, wyniki badań udokumentowane są fotografiami. Doktorant wykazał się znajomością licznych metod badawczych, umiejętnością stawiania hipotez badawczych, a także potrafił zaplanować doświadczenia, które systematycznie realizował, co świadczy o dobrym przygotowaniu naukowym Doktoranta. Część badań została wykonana we współpracy z innymi ośrodkami naukowymi, co świadczy o umiejętności pracy Doktoranta w zespole badawczym.

**Badania biotechnologiczne** dotyczyły mikrorozmnażania *L. flos-cuculi*, które obejmowało namnażanie z części wierzchołkowych pędów na agarowym podłożu Murashige i Skoog'a (MS) uzupełnionym cytokininą, benzyloaminopuryną (BAP) i jedną z auksyn (kwasem indolilo-3-octowym, IAA, lub kwasem naftylo-1-octowym, NAA) w różnej kombinacji stężeń, ukorzenianie otrzymanych pędów na podłożu MS z pełną lub zredukowaną do połowy zawartością mikro- i makroelementów bez regulatorów wzrostu lub uzupełnionych jedną z 3 auksyn (IAA, NAA lub kwasem indolilo-3-masłowym, IBA) w stężeniu 0,1 mg L<sup>-1</sup> oraz aklimatyzację roślin i ich hodowlę w gruncie, na poletku eksperymentalnym. **Doktorant opracował wydajną metodę namnażania pędów *L. flos-cuculi* z wierzchołkowych części pędów**. Po 6 tygodniach z jednego eksplantatu można było uzyskać 16 pędów. Zaletą tej metody mikrorozmnażania jest uzyskanie roślin nieróżniących się fenotypowo i genetycznie od rośliny macierzystej, ponieważ powstają z istniejących merystemów, co także potwierdził Doktorant, przeprowadzając pomiar zawartości jądrowego DNA w materiale uzyskanym z kultur *in vitro* za pomocą cytometrii przepływowowej, która od lat

jest najbardziej popularną metodą do tego celu stosowaną. W przypadku namnażania roślin jest niezmiernie ważne zachowanie stabilności genetycznej i tym samym otrzymanie jednorodnego materiału roślinnego z kultur *in vitro*, co ma szczególne znaczenie dla wykorzystania tego materiału, jako surowca leczniczego. Pędy firletki ukorzeniały się z powodzeniem na podłożach bez, jak i uzupełnionych auksyną. Ponad 90% uzyskanych roślinek aklimatyzowało się do warunków *ex vitro* (publikacja P2., *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2019).

Doktorant prowadził również kulturę całych roślin firletki poszarpanej w płynnym, wytrząsanym podłożu oraz wyprowadził kultury kalusowe z różnych eksplantatów (hipokotyl, liście, korzenie) pozyskanych z aseptycznie wyhodowanych siewek (publikacja P2., *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2019).

W ramach badań Pan mgr Michał P. Maliński przeprowadził także **analizę fitochemiczną materiału uzyskanego z kultur *in vitro***. Badania obejmowały identyfikację i określenie zawartości 20-hydroksyekdysonu i polipodiny B z zastosowaniem metody HPLC-DAD (publikacja P2., *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2019) oraz izolację tych dwóch ekdysteroidów z roślin zregenerowanych *in vitro* rosnących w gruncie, które charakteryzowały się najwyższą ich zawartością spośród innych badanych surowców. Identyfikacja tych związków została przeprowadzona z wykorzystaniem nowoczesnych metod spektralnych (publikacja P4., *Molecules*, 2021). Doktorant dokonał także analizy jakościowej i ilościowej związków w materiale pozyskanym z kultur *in vitro* i ze stanowiska naturalnego (publikacja P3., *Plants*, 2021).

**Na podkreślenie zasługuje fakt, że wytrząsane kultury całych roślin już po 6 tygodniach hodowli wykazywały wysoką biomasę korzeni, które charakteryzowały się także wysoką zawartością 20-hydroksyekdysonu i polipodiny B porównywalną z zawartością tych dwóch ekdysteroidów w korzeniach roślin zregenerowanych *in vitro* rosnących w gruncie przez 2 okresy wegetacyjne.** Ponadto, rośliny zregenerowane *in vitro* rosnące w gruncie, zarówno kwitnące części nadziemne, jak i korzenie, wytwarzały 2-krotnie wyższe ilości ekdysteroidów niż rośliny ze stanowiska naturalnego (publikacja P2., *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2019). Wyniki te pokazują, że kultury *in vitro* *L. flos-cuculi* mogą być w przyszłości wydajnym i alternatywnym źródłem pozyskiwania surowca i związków biologicznie czynnych z tego gatunku.

W kalusie, jak i roślinach zregenerowanych *in vitro*, rosnących na poletku doświadczalnym Doktorant potwierdził metodą UHPLC-MS w sumie obecność 55 metabolitów wtórnych należących do różnych klas związków, w tym do saponin triterpenowych (pochodne glikozydowe gipsogeniny i kwasów kwilajowego, gipsogeninowego i oleanolowego), ekdysteroidów (m.in. **ajugasteron C i integristeron A**, które zostały **zidentyfikowane w tym gatunku po raz pierwszy**), flawonoidów, kwasów fenolowych (**kwas chinowy i jego pochodne określone po raz pierwszy w *L. flos-cuculi***) oraz oznaczył całkowitą zawartość związków fenolowych, kwasów fenolowych i flawonoidów.

Całkowita zawartość związków fenolowych, flawonoidów i kwasów fenolowych w ekstraktach była skorelowana z właściwościami przeciwutleniającymi badanych surowców. Najsilniejsze właściwości przeciwutleniające wykazywały kwiatostany roślin ze stanowiska naturalnego (publikacja P3., *Plants*, 2021). Aktywność przeciwutleniająca została oszacowana z zastosowaniem prostych, powszechnie stosowanych testów chemicznych takich, jak zmiatanie wolnych rodników (DPPH) czy redukcja jonów żelaza (FRAP). Czuję jednak pewien niedosyt, dlaczego Doktorant nie pokusił się o przeprowadzenie analizy jakościowej związków w płynnej kulturze całych roślin skoro charakteryzowały się one wysoką zawartością ekdysteroidów w korzeniach już po 6 tygodniach hodowli porównywalną z tą w korzeniach 2-letnich roślin zregenerowanych *in vitro* rosnących w glebie.

Leczenie zakażeń bakteryjnych, grzybiczych czy też pasożytniczych kojarzone jest głównie z antybiotykami. Jednak powikłania po ich stosowaniu i wzrost oporności na nie spowodowały, że zaczęto szukać alternatywnych rozwiązań, w postaci bezpiecznych, nietoksycznych dla ludzi związków pochodzenia roślinnego.

Z uwagi na obecność w firletce saponin, które wykazują znaną aktywność przeciwgrzybiczą, niefrakcjonowane wyciągi metanolowe *L. flos-cuculi* Doktorant poddał ocenie działania wobec wybranych patogenów grzybowych: *Candida albicans* ATCC 10231, trzech dermatofitów: *Cryptococcus neoformans* (szczep kliniczny), *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *T. rubrum* ATCC 28188 oraz dwóch gatunków z rodzaju *Aspergillus*, *A. brasiliensis* ATCC 16404 oraz *A. fumigatus* ATCC 204305. Najwyższą aktywność przeciwgrzybiczą (MIC = 1,25 mg mL<sup>-1</sup>) wykazywały ekstrakty z korzeni roślin zregenerowanych *in vitro* rosnących w glebie wobec *C. neoformans* i *A. brasiliensis*. **Ponadto, Doktorant po raz pierwszy wykazał pelzakobójcze działanie ekstraktów z firletki poszarpanej i wyizolowanych ekdysteroidów przeciwko trofozoitom patogennego szczepu klinicznego Ac55 *Acanthamoeba castellanii*, genotyp T4.** Najsilniejsze właściwości przeciwpelzakowe posiadała frakcja 80% wodno-metanolowa ekstraktu z korzeni roślin otrzymanych w wyniku mikrorozmnażania rosnących w glebie, która także wykazywała silną ostrą toksyczność w teście Microtox, który oparty jest na inhibicji bioluminescencji bakterii *Aliivibrio fischeri* (publikacja P4., *Molecules*, 2021).

Materiał roślinny zastosowany, jako materiał porównawczy do badań fitochemicznych i biologicznych został zebrany przez Doktoranta ze stanu naturalnego z podmokłych łąk w okolicach Kuźnicy Trzeńskiej (województwo wielkopolskie). W tym miejscu poprosiłabym Doktoranta o wyjaśnienie, gdzie znajdowało się poletko eksperymentalne, na którym rosły rośliny namnożone *in vitro*, ponieważ może to być istotne dla wyjaśnienia różnic w zawartości metabolitów wtórnych w tych roślinach i roślinach ze stanowiska naturalnego, bo jak wiadomo miejsce zbioru roślin,

jest jednym z czynników odpowiedzialnym za zmienność składu chemicznego czy też zawartość metabolitów wtórnych w materiale roślinnym.

W trakcie przygotowywania recenzji nasunęły mi się uwagi i pytania dotyczące badań, które chciałabym skierować do Doktoranta:

1. Dlaczego kalus był hodowany w ciemności? Czy badano wpływ światła na tworzenie i wzrost tkanki kalusowej?
2. Doktorant opisał wydajną procedurę mikrorozmnażania *L. flos-cuculi* z zastosowaniem BAP. Czy Doktorant sprawdzał wpływ innych cytokinin na namnażanie tego gatunku w kulturze *in vitro*? Czy pędy firletki poszarpanej namnażały się podczas hodowli w płynnej, wytrząsanej kulturze?
3. Dlaczego nie poddano badaniom fitochemicznym samych kwiatostanów z roślin zregenerowanych *in vitro* rosnących w glebie, tym bardziej, że w roślinach pochodzących z naturalnego stanowiska surowiec ten charakteryzował się najwyższą zawartością ekdysteroidów?
4. Dlaczego do badań wykorzystano kwitnące rośliny?
5. Doktorant wysunął wniosek (str. 51), że po 6 miesiącach z 1 eksplantatu można otrzymać aż 65 000 pędów. Proszę o wyjaśnienie.
6. Czy była podjęta próba transformacji *L. flos-cuculi* z zastosowaniem bakterii *Rhizobium rhizogenes* w celu uzyskania korzeni włośnikowatych?
7. Na str. 51 jest nieścisłość w dyskusji: „Istnieje również wiele przykładów utraty tej zdolności w kulturach niezróżnicowanych komórek, np. *Rhaponticum carthamoides* [Skąła i wsp. 2015] ...”. W cytowanej pracy nie badano poziomu ekdysteroidów w niezróżnicowanych kulturach komórkowych.

#### **Podsumowanie i wniosek końcowy**

Podsumowując, podjęty cel badań był konsekwentnie realizowany podczas części eksperymentalnej i tym samym hipoteza postawiona na początku badań została zrealizowana. Wyniki badań Doktoranta poszerzają wiedzę o dotychczas mało poznanym gatunku, *L. flos-cuculi*. Badania biotechnologiczne na tym gatunku zostały przeprowadzone po raz pierwszy i dostarczyły wiedzy o nowym, wydajnym źródle ekdysteroidów. Nowym wynikiem było zidentyfikowanie ajugasteronu C, intergisteronu A, kwasu chinowego i jego pochodnych oraz wykazanie działania pełzakobójczego wobec *A. castellani* ekstraktów z firletki poszarpanej, jak i wyizolowanych ekdysteroidów. Uzyskane wyniki mają nie tylko wartość poznawczą, ale mogą mieć także w przyszłości znaczenie aplikacyjne, w odniesieniu do nowych surowców roślinnych bogatych w cenne metabolity wtórne, głównie ekdysteroidy, które znane są m.in. z właściwości adaptogennych. Dorobek naukowy Doktoranta jest liczny i wartościowy, w postaci publikacji naukowych o wysokich wskaźnikach bibliometrycznych (sumaryczny IF wszystkich prac wynosi 13,567).

W mojej ocenie rozprawa doktorska spełnia wszystkie przyjęte ustawowo kryteria stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora wobec powyższego wnioskuję do Wysokiej Rady Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr Michała P. Malińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wartość merytoryczną uzyskanych wyników i dorobek naukowy Pana mgr Michała P. Malińskiego wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

*Ewa Słota*