



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ

KNO | Krajowy Naukowy
Ośrodek Wiodący

KATEDRA I ZAKŁAD BROMATOLOGII

Prof. dr hab. Piotr Szefer

80-416 Gdańsk, al. Gen. J. Hallera 107

tel./ fax. 058 349-10-89

e-mail: pszefer@gumed.edu.pl; strona internetowa: <http://szefer.gumed.edu.pl/>

Gdańsk, 26.07.2022 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej autorstwa mgr Marty Cegłowskiej pt. „Wybrane bałtyckie cyjanobakterie jako potencjalne źródło związków biologicznie aktywnych – Selected Baltic cyanobacteria as a potential source of biologically active compounds”

**wykonanej w Instytucie Oceanologii Polskiej Akademii Nauk
pod kierunkiem**

Prof. dr hab. Alicji Kosakowskiej

Sinice należą do jednych z najstarszych organizmów występujących prawie w każdym środowisku przyrodniczym, ze względu na ich odporność na ekstremalne warunki klimatyczne, takie jak m.in. długotrwałe susze, czy bardzo wysokie temperatury. Natomiast, rodzaj podłoża, odpowiadający za wysoką kwasowość nie wpływa destrukcyjnie na funkcje życiowe cyjanobakterii.

Spośród najdogodniejszych warunków sprzyjających rozwojowi sinic w ekosystemach morskich można wyróżnić słoną wodę, jej wysoką temperaturę, a także zanieczyszczenie ściekami i nawozami z pól. Wszystkie te szkodliwe czynniki stanowią poważne zagrożenie w prawidłowym funkcjonowaniu człowieka w aspekcie zarówno ekonomicznym, jak i społecznym, a więc w szerszym rozumieniu dobrostanu społeczeństwa. Z jednej strony, stanowią istotną składową fitoplanktonu odgrywając kluczową rolę ekologiczną, a także biorąc aktywny udział w globalnej produkcji pierwotnej, a ponadto w globalnym obiegu węgla i azotu. Z drugiej zaś strony, dogodne warunki do ich wzrostu prowadzą do pojawiania się tzw. masowych zakwitów wody, a tym samym zakłócenia funkcjonowania ekosystemu. Generowane w tak niesprzyjających warunkach toksyny sinicowe, które zazwyczaj występują w wyraźnie zanieczyszczonych akwenach o wysokim stopniu eutrofizacji, czyli przeżyźnienia, mają zdolność syntezy licznych metabolitów wtórnych, m.in. alkaloidów, poliketydów, peptydów oraz terpenów. Uważa się, że profile peptydowe stanowią szczególną właściwość, charakterystyczną dla danego szczepu.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że spośród najczęściej testowanych cyjanobakterii wyróżnia się toksyny wykazujące aktywność biologiczną o znaczącej cytotoksyczności, chociaż istnieje także wiele doniesień w piśmiennictwie światowym, z których wynika, że niektóre cyjanobakterie wykazują się aktywnością przeciwnowotworową, przeciwwirusową lub też zdolnością do modyfikowania aktywności enzymów. Z powyższych względów, rozpoznanie tak żywotnej, i zarazem złożonej problematyki badawczej było niewątpliwie inspiracją oraz poważnym wyzwaniem stojącym przed Doktorantką, a jej dysertacja ściśle wpisuje się w interesujący oraz oryginalny nurt badawczy.

Najogólniej rzecz ujmując podstawowym celem pracy było poszerzenie wiedzy dotyczącej dwóch szczepów bakterii bałtyckich cyjanobakterii, tj. *Pseudanabaena* cf. *galeata* CCNP1313 oraz *Limnoraphis* sp. CCNP 1324 z uwzględnieniem analizy produkowanych przez ww. organizmy metabolitów oraz ich aktywności biologicznej.

W celu pełnej realizacji tak zdefiniowanego zadania badawczego należało przeprowadzić cykl badań, których wyniki umożliwiłyby:

- przeprowadzenie charakterystyki *Pseudanabaena* cf. *galeata* CCNP1313;
- przeprowadzenie charakterystyki *Limnoraphis* sp. CCNP 1324;
- zoptymalizowanie procesu izolacji cyjanometabolitów;
- zidentyfikowanie peptydów syntezowanych przez oba szczepy cyjanobakterii;
- ocenę efektów wyizolowanych związków z zastosowaniem testów *in vitro* przy wykorzystaniu linii komórkowych, enzymów ludzkiego cytochromu P450, miRNA, koronawirusów oraz flawiwirusów, a także stabilności metabolicznej cyjanometabolitów eksponowanych na działanie ludzkich enzymów wątrobowych.

Na przedłożoną do zaopiniowania 284-stronicową polsko- i angielską wersję dysertacji składa się Streszczenie, Wstęp, Hipoteza badawcza, Materiały i metody badań, Wyniki i dyskusja oraz Podsumowanie. Ponadto, w końcowej części rozprawy Autorka zamieściła spis swoich osiągnięć naukowo-badawczych oraz organizacyjnych. Rozprawę wieńczy wykaz ponumerowanego, poprawnie cytowanego piśmiennictwa specjalistycznego w liczbie 139 pozycji oraz wykaz stosowanych akronimów i skrótów. Dwa rozdziały, tj. *Materiały i metody badań* oraz *Wyniki i dyskusja* składają się z poszczególnych podrozdziałów, co w znaczącym stopniu ułatwia czytelnikowi studiowanie zaprezentowanego przez Autorkę swojego, wysoce interesującego, opracowania. W końcowej części swojej rozprawy, Doktorantka dokumentuje fakt opublikowania wyników swoich badań w postaci czterech prac na łamach filadelfijskich periodyków naukowych, tj. *Algal Res.* (IF=4,401), *Toxins* (IF=4,546) oraz *Marine Drugs* (IF=5,118).

Po zapoznaniu się z częścią teoretyczną pracy, recenzent rozprawy nie ma najmniejszych wątpliwości, że Doktorantka w sposób wnikliwy zapoznała się z aktualnym stanem wiedzy związanym z jej zainteresowaniami naukowymi. Było to

możliwe, dzięki umiejętnemu dobraniu i wykorzystaniu licznych, pozycji literaturowych o zasięgu światowym. Tym sposobem praca znacząco zyskała na wartości w aspekcie pogłębionej interpretacji uzyskanych rezultatów badawczych. Świadczy to o przyswojeniu i gruntownym zrozumieniu przez Autorkę współczesnych zagadnień dotyczących charakterystyki, o tak długiej historii i ewolucji, interesującej grupy organizmów, jakimi są cyjanobakterie. W tej części pracy, Doktorantka omówiła kwestię szkodliwego ich wpływu na zdrowie ludzi oraz zwierząt, a także nadmieniła o doniesieniach literaturowych wskazujących na aktywność biologiczną tychże organizmów przejawiającą się działaniem przeciwnowotworowym, przeciwwirusowym, czy modyfikującym aktywność enzymów. Odnosząc się do tej części rozprawy można skonstatować, że została poprawnie zredagowana i umiejętnie wprowadza czytelnika w całokształt zagadnień rozważanych w dalszej części pracy, tj. w części metodycznej.

Otóż, w części eksperymentalnej pracy mgr Marta Cegłowska w pełni dokumentuje poprawność przeprowadzonych przez nią badań, charakteryzujących się wysokim poziomem merytorycznym, zarówno w aspekcie metodyczno-analitycznym, jak i interpretacyjnym. Autorka w sposób zwarty, a zarazem wnikliwy przybliży czytelnikowi wyniki swoich badań rzetelnie udokumentowanych w formie tabelarycznej i graficznej, w tym diagramów w postaci drzewa filogenetycznego, fotogramów oraz widm fragmentacyjnych peptydu PG725 i galeapeptyny GP729. Podsumowując część eksperymentalną należy zaznaczyć, że badania zostały od strony analitycznej właściwie zaplanowane, dane pomiarowe należycie opisane i zinterpretowane, a założone cele konsekwentnie zrealizowane. Zatem cały warsztat badawczy nie budzi żadnych zastrzeżeń.

Recenzja nie byłaby pełna, gdyby nie zawierała uwag krytycznych, chociaż należy podkreślić, że praktycznie wszystkie z nich dotyczą wyjątkowo nielicznych i bardzo drobnych błędów natury redakcyjnej, czy interpunkcyjnej. Otóż, one:

- str. 34, wiersz 7 od dołu; jest: „(from 2.76 (SD = 0.50)” zamiast: „{from 2.76 (SD = 0.50)”
- str. 34, wiersz 6 od dołu; jest: „respectively)” zamiast „respectively}”
- str. 48, podpis Tabeli 4; jest: „samples ((NT)” zamiast samples „{(NT)”
- str. 60, wiersz 14 od dołu; jest: „2016].” zamiast „2016],”
- str. 60, wiersz 13 od dołu; jest: „A ich” zamiast „a ich”
- str. 63, wiersz 3 od dołu; jest: „koronawiruwów” zamiast „koronawirusów”
- str. 74, wiersz 2 od góry; jest: „Cyjanometabolitóe” zamiast „Cyjanometabolitów”
- str. 90, podpis pod rys. 10, wiersz 13 od dołu; jest: „peptudu PG725” zamiast „peptydu PG725”.

Odnosnie statystycznego opracowania wyników, Doktorantka zastosowała metodę największej wiarygodności (maximum likelihood), która bazuje na założeniu, że wszystkie drzewa rozpatrywać można jako alternatywne hipotezy wyjaśniające

obserwowaną różnorodność. Co prawda, mają zastosowanie jeszcze inne techniki chemometryczne obrazowania odległości genetycznej, jak np. wielowariancyjna analiza skalowanie wielowymiarowe (MDS), czy analiza głównych składowych (PCA), to jednak znacznie bardziej rzetelne wyniki uzyskać można wykorzystując metodę zastosowaną przez Doktorantkę. Ponadto, poprawnie wykorzystowała test Kruskal-Wallis, jako nieparametryczną alternatywę jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) przy zadanych poziomach istotności statystycznej $p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,001$.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest przykładem uwierzczonej pełnym sukcesem próby, po raz pierwszy przeprowadzonego wnikliwego opisu bałtyckich cyjanobakterii *Pseudanabaena galeata* CCNP1313 oraz *Limnoraphis* sp. CCNP 1324 z uwzględnieniem ich charakterystyki chemotypowej, a w przypadku *Pseudanabaena galeata* CCNP1313 dodatkowo genotypowej. Zidentyfikowano nowe analogi aeruginozamidów syntetyzowanych przez CCNP1324, a w przypadku niektórych AEG wygenerowanych przez ten właśnie szczep stwierdzono modyfikację w grupie tiazolowej. W tym miejscu należy podkreślić, że ową modyfikację można uznać za nowatorskie osiągnięcie Doktorantki. Innym poważnym dokonaniem badawczym było zidentyfikowanie w próbkach CCNP1313 aż 45 nieopisanych dotychczas w literaturze światowej peptydów. Spośród tych związków, 14 z nich zostało ponadto opisanych w oparciu o sporządzoną charakterystykę ich struktur chemicznych, a te nowo wykryte określono mianem galeapeptydami (GP) oraz *Pseudanabaena galeata* peptydami (PG). Tym sposobem mgr Marta Cegłowska przyczyniła się do wzbogacenia bazy danych opisanych w swojej dysertacji dotyczących metabolitów cyjanobakterii CyanoMetDB. Zatem, na szczególną uwagę zasługują nie tylko nowatorskie elementy poznawcze prowadzonych badań, ale także ich wielodyscyplinarny charakter, wymagający opanowania rzetelnej wiedzy i praktycznych umiejętności m.in. z zakresu analityki chemicznej. Ponadto, przedłożona do zaopiniowania rozprawa została starannie zaplanowana i zrealizowana, zarówno pod względem poznawczym i metodycznym, jak i utylitarnym. Wymownym przykładem tak powszechnie cenionego praktycznego aspektu prowadzonych badań jest stwierdzenie przez Doktorantkę, że szczep CCNP1324 syntetyzuje metabolity cytotoksyczne w stosunku do gruczolaka piersi (T47D), wykazując hamujące działanie ludzkiego bloku enzymatycznego cytochromu P450, jednocześnie promując generowanie reaktywnych form tlenu. Natomiast, szczep CCNP1313 jest odpowiedzialny za syntezę nie tylko metabolitów cytotoksycznych w stosunku do gruczolaka piersi, ale również ludzkich komórek tkanki łącznej (HDF) oraz metabolitów o właściwościach przeciwwirusowych względem wirusa Zachodniego Nilu, wirusa ostrej niewydolności oddechowej i ludzkiego koronawirusa OC43. Powyższe przytoczone przez Autorkę rozprawy argumenty pozwalają sformułować konkluzję, że bałtyckie cyjanobakterie stanowią potencjalne zagrożenie dla dobrostanu ludzi i zwierząt, ale z drugiej strony są istotnym źródłem substancji o działaniu przeciwnowotworowym i przeciwwirusowym.

Owe mikroorganizmy, zwane potocznie sinicami mogą zatem stanowić alternatywę dla tej samej właśnie grupy zamieszkującej ekosystemy strefy tropikalnej. Zgodnie z domniemaniem mgr Marty Cegłowskiej, daje to uzasadnioną podstawę do takiego sformułowania, że *nie tylko organizmy z rejonów tropikalnych stanowią interesujący materiał do badań nad biotechnologicznym wykorzystaniem produktów naturalnych pochodzenia morskiego, ale także cyjanobakterie z Morza Bałtyckiego.*

Najogólniej rzecz ujmując, Autorka w pełni wywiązała się z nałożonego na nią zobowiązania badawczego, tzn. przeprowadziła w sposób poprawny, udokumentowany publikacją, cykl interdyscyplinarnych badań ukoronowanych pełnym sukcesem. Doktorantka stanęła przed ambitnym wyzwaniem badawczym, któremu w pełni sprostała, poprawnie wykorzystując szereg zaawansowanych narzędzi badawczych. Uzyskane przez nią wyniki wnoszą nowatorskie elementy poznawcze przyczyniając się do wzbogacenia naszej wiedzy dotyczącej charakterystyki metabolitów eksplorowanych cyjanobakterii.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska w pełni odpowiada ustawowym kryteriom stawianym pracom doktorskim.

Ponadto, należy podkreślić, że przeprowadzone przez mgr Martę Cegłowską prace badawcze, charakteryzujące się dużym 'ładunkiem' nowości naukowej, można uznać za właściwie zaprojektowane, a także poprawnie wykonane. Doktorantka odznaczyła się w czasie realizacji zadań badawczych dużą biegłością analityczną, determinacją, a także dociekliwością na etapie interpretacji danych pomiarowych. Uzyskała wysoce znaczące, interesujące, a także obiecujące wyniki na podstawie właściwie przeprowadzonego cyklu analiz. Wnioski zredagowane z właściwą dozą ostrożności samokrytycyzmu naukowego znajdują pełne potwierdzenie w bogatym materiale faktograficznym, co świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Po uwzględnieniu ww. argumentów, recenzent z pełnym przekonaniem stawia wniosek o wyróżnienie pracy. Dysertacja odznacza się dużym ładunkiem aktualności oraz nowości naukowej, a ponadto oprócz walorów poznawczych ma również wartość użyteczną. Szczegółowe uzasadnienie ww. wniosku zostało przesłane w oddzielnym dokumencie.

Biorąc powyższe po uwagę, praca doktorska autorstwa mgr Marty Cegłowskiej w pełni spełnia warunki określone w ustawie o stopniach i tytułach naukowych i z tym przekonaniem recenzent stawia wniosek o dopuszczenie Doktorantki przez Wysoką Radę Naukową Instytutu Oceanologii PAN w Sopocie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra i Zakład Bromatologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego



prof. dr hab. n. farm. Piotr Szefer



GDZAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ



Krajowy Naukowy
Ośrodek Wiodący

KATEDRA I ZAKŁAD BROMATOLOGII

Prof. dr hab. Piotr Szefer

80-416 Gdańsk, al. Gen. J. Hallera 107

tel./ fax. 058 349-10-89

e-mail: pszef@gumed.edu.pl; strona internetowa: <http://szefer.gumed.edu.pl/>

Gdańsk, 26.07.2022 r.

UZASADNIENIE

wniosku o wyróżnienie pracy doktorskiej autorstwa mgr Marty Cegłowskiej pt. „Wybrane bałtyckie cyjanobakterie jako potencjalne źródło związków biologicznie aktywnych – Selected Baltic cyanobacteria as a potential source of biologically active compounds”

**wykonanej w Instytucie Oceanologii Polskiej Akademii Nauk
pod kierunkiem**

Prof. dr hab. Alicji Kosakowskiej

Dysertacja zasługuje na wyróżnienie z uwagi na fakt, że Doktorantka **(1)** uzyskała oryginalne wyniki badań dostarczających wysoce interesujące informacje, rzucające nowe światło na szereg zagadnień związanych z obszarem tematycznym przedłożonej do zaopiniowania rozprawy. Ponadto, legitymuje się ona **(2)** znaczącym dorobkiem naukowo-badawczym potwierdzającym jej kompetencje analityczne, szczególnie przydatne na etapie realizacji ambitnych, zakrojonych na szeroką skalę zadań badawczych.

Ad.1). Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest przykładem uwieńczonej pełnym sukcesem próby wykazania, że wybrane bałtyckie cyjanobakterie jawią się jako potencjalne źródło związków biologicznie aktywnych. Uzyskane przez mgr Martę Cegłowską wyniki wnoszą nowatorskie elementy poznawcze przyczyniając się do wzbogacenia naszej wiedzy dotyczącej charakterystyki metabolitów eksplorowanych cyjanobakterii. Należy podkreślić, że Autorka w pełni wywiązała się z nałożonego na nią zobowiązania badawczego oraz stanęła przed poważnym wyzwaniem badawczym, któremu w pełni sprostała, poprawnie wykorzystując szereg zaawansowanych narzędzi badawczych. Uzyskane przez nią wyniki wnoszą

nowatorskie elementy poznawcze w zakresie wnikliwego opisu bałtyckich cyjanobakterii *Pseudanabaena galeata* CCNP1313 oraz *Limnoraphis* sp. CCNP 1324 z uwzględnieniem ich charakterystyki chemotypowej, a w przypadku *Pseudanabaena galeata* CCNP1313 dodatkowo genotypowej.

Zatem, przeprowadzone przez mgr Martę Cegłowską prace badawcze, charakteryzują się dużym ładunkiem nowości naukowej. Doktorantka odznaczyła się w czasie realizacji przedsięwzięć badawczych dużą biegłością analityczną i determinacją, a na etapie interpretacji danych pomiarowych także dociekliwością i zrozumieniem wielokierunkowych mechanizmów występujących w tak złożonych układach biochemicznych charakterystycznych dla eksplorowanych próbek. Uzyskała wysoce interesujące, a także obiecujące wyniki dzięki właściwie przeprowadzonemu cyklowi analiz. Wnioski zostały zredagowane z właściwą dozą ostrożności i znajdują pełne potwierdzenie w bogatym materiale faktograficznym.

Ad. 2). Na dorobek naukowy Doktorantki składają się 4 artykuły naukowe stanowiące podstawę pracy doktorskiej, opublikowane na łamach czasopism filadelfijskich o łącznym współczynniku oddziaływania, tj. IF =19,183. Należy podkreślić fakt, że jest ona wiodącą autorką we wszystkich czterech publikacjach i do tego w charakterze autora korespondującego w trzech artykułach. Odnośnie jej dorobku publikacyjnego po wyłączeniu ww. 4 artykułów wchodzących w skład doktoratu, mgr Marta Cegłowska jest współautorką 10 publikacji (w tym pierwszą autorką w 2 artykułach) o łącznym współczynniku oddziaływania (IF) wynoszącym 49.0. Uczestniczyła w 37 konferencjach, głównie o zasięgu międzynarodowym (25), przy czym w 12 z nich w charakterze pierwszego autora. Występowała 25-krotnie w charakterze prelegenta, w tym 7-krotnie na forum międzynarodowym (Słowenia, Szkocja, Grecja, Litwa, Hiszpania).

Ponadto, Kandydatka przyczyniła się efektywnie do pozyskiwania zewnętrznych środków finansowych na wykonywanie prac badawczych, czego dowodem jest jej zaangażowanie w realizacji zadań badawczych w ramach 4 projektów naukowych NCN – OPUS. Była również głównym wykonawcą grantu COST, a także realizowała zadanie badawcze w WP2 w ramach grantu norweskiego.

Angażowała się we współorganizacji XI Ogólnopolskiej Konferencji Hydromikrobiologicznej HYDROMICRO 2012 w Sopocie, I Konferencji Badaczy Morza w Sopocie oraz spotkania Grupy Roboczej Harmful Algal Bloom Dynamics (WGHARD), International Council for Exploration of the Sea w Sopocie.

Doktorantka może wykazać się prowadzeniem współpracy międzynarodowej w ramach COST Action – European transdisciplinary networking platform for Marine Biotechnology w charakterze członka Management Committee. Ponadto, realizuje zadania badawcze z Department of Environmental Science and Analytical Chemistry, Stockholm University (Szwecja) oraz z Marine Research Institute, Klaipeda University (Litwa).

Jest członkiem takich organizacji naukowych jak:

- Komitet Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiskowej, Gdański Oddział PAN,
- Sekcja Mikrobiologii Środowiskowej przy Polskim Towarzystwie Mikrobiologów,
- Polskie Towarzystwo Mikrobiologów,
- Konsorcjum Mikrobiologów Morza, członków Komisji ds. Mikrobiologii i Biotechnologii Morskiej Komitetu Badań Morza PAN.

Biorąc powyżej przytoczone argumenty pod uwagę, recenzent z pełnym przekonaniem stawia wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej autorstwa mgr Marty Cegłowskiej pt. „Wybrane bałtyckie cyjanobakterie jako potencjalne źródło związków biologicznie aktywnych – Selected Baltic cyanobacteria as a potential source of biologically active compounds”. Dysertacja odznacza się dużym ładunkiem aktualności oraz nowości naukowej, a ponadto oprócz walorów poznawczych można wykazać w pracy istotne elementy użyteczne.

Katedra i Zakład Bromatologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

prof. dr hab. n. farm. Piotr Szefer