

Prof. dr hab. inż. Aleksandra Królicka
Uniwersytet Gdański
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych
ul. Abrahama 58, 80-307 Gdańsk
tel.: +48 58 523 6305
E-mail: aleksandra.krolicka@ug.edu.pl

Gdańsk, 04.11.2024r.

Strona 1

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pana lek., mgr inż. Mateusza Kawki zatytułowanej
„Biotechnologiczne metody intensyfikacji biosyntezy aktywnych biologicznie
naftochinonów w kulturach *in vitro* *Rindera graeca* (A. DC.) Boiss. & Heldr.”
wykonanej pod kierunkiem Pani promotor prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Katarzyny
Sykłowskiej-Baranek oraz promotor pomocniczej dr n. biol. Ireny Bubko.

Rozprawa doktorska Pana lek., mgr inż. Mateusza Kawki została wykonana w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Badania wykonane w ramach realizacji pracy doktorskiej były finansowane z dwóch projektów: grantu Narodowego Centrum Nauki, konkurs Preludium oraz grantu BIOTECHMED-2 w ramach programu Ministerstwa Edukacji i Nauki „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza”. W pierwszym projekcie Doktorant był kierownikiem, a w drugim wykonawcą. Finansowanie zewnętrzne badań pozwoliło na wykonanie wielu bardzo ciekawych eksperymentów, które zaowocowały szeregiem prac naukowych, a w rezultacie ukończeniem pracy doktorskiej.

Przedstawiona do recenzji dysertacja składa się z czterech oryginalnych publikacjach naukowych (eksperymentalnych), dwóch prac przeglądowych oraz patentu (Pat. 242593) udzielonego 04.10.2023 roku „Zastosowanie aerozeli krzemoorganicznych do proliferacji i immobilizacji biomasy roślinnej w hodowlach *in vitro* oraz zastosowanie aerozeli do intensyfikacji produkcji metabolitów roślinnych i intensyfikacji ekstrakcji *in situ* metabolitów wtórnych w hodowlach *in vitro*”. Łączny współczynnik oddziaływania (*Impact Factor, IF*) 6 publikacji wynosi 19,301, co przekłada się na 460 punktów ministerialnych. Cztery publikacje oryginalne mieszczą się w kwartylu 1 (Q1) lub 2 (Q2) w zależności od kategorii. Dwie pozostałe publikacje przeglądowe które zostały opublikowane w *Prospects*

in Pharmaceutical Sciences są w języku polskim, ale stanowią bardzo dobre wprowadzenie dotyczące zastosowania roślinnych kultur *in vitro* do pozyskiwania biologicznie czynnych metabolitów wtórnych oraz przeróżnych technik stosowanych do podwyższenia ich poziomu w tkankach roślinnych. Biorąc pod uwagę niewielką liczbę publikacji w języku polskim dotyczących tego tematu stwierdzam, że są one bardzo wartościowe szczególnie dla ludzi, którzy stawiają pierwsze kroki w dziedzinie pozyskiwania metabolitów wtórnych z wykorzystaniem roślinnych kultur *in vitro*. Prace przeglądowe są z 2017 roku, a pozostałe prace oryginalne oraz patent ukazały się w latach 2021 – 2024 i zostały zauważone przez środowisko naukowe ze względu na 24-krotne cytowanie.

W pracy doktorskiej Pan lek., mgr inż. Mateusz Kawka wprowadził czytelnika w zagadnienia dotyczące zastosowania immobilizacji tkanek roślinnych na nośnikach w celu uzyskania zwiększonej produktywności cennych metabolitów zawartych w roślinach. Podjęcie badań nad zastosowaniem immobilizacji w hodowli *in vitro* korzeni anatomicznych oraz transformowanych *Rindera graeca* uważam za w pełni uzasadnione. Roślina ta należąca do rodziny Boraginaceae zawiera bowiem w swoich tkankach cenne metabolity wtórne jak pochodną furanonaftochinonu – rinderol, pochodne naftochinonu (ze szczególnym uwzględnieniem deoksyzikoniny), związki fenolowe oraz toksyczne alkaloidy pirolizydynowe. Badania nad lipofilnymi naftochinonami prowadzone są w Katedrze i Zakładzie Biologii Farmaceutycznej od wielu lat i konsekwentnie przynoszą nowe i bardzo wartościowe wyniki. Naftochinony zawarte w tkankach *R. graeca* badane były przez Doktoranta w kontekście aktywności przeciwnowotworowej. Pan lek., mgr inż. Mateusz Kawka we prowadzeniu opisał dotychczasowe badania, które zostały wykonane przez inne ośrodki pod kątem tejże aktywności oraz mechanizmów działania pochodnych naftochinonów korzystając z 44 pozycji literaturowych. Biorąc pod uwagę fakt, że nowotwory złośliwe stanowią drugą przyczynę zgonów w USA oraz w Europie, poszukiwanie nowych aktywnych cząsteczek zdolnych do zwalczania nowotworów jest niezmiernie istotne. W związku z powyższym cele pracy doktorskiej obejmujące opracowanie metod biotechnologicznych pozwalających na podwyższenie poziomu wytwarzania rinderolu i innych pochodnych szikoniny poprzez zastosowanie techniki immobilizacji biomasy i adsorpcji *in situ* metabolitów wtórnych oraz wykonanie badań nad mechanizmem aktywności cytotoksycznej rinderolu uważam za zasadne i ekonomicznie uzasadnione. W przedstawionej pracy doktorskiej Doktorant przedstawił siedem hipotez

badawczych, które zostały zweryfikowane w trakcie badań. Zabrakło mi tylko omówienia materiałów i metod stosowanych przez Pana lek., mgr inż. Mateusza Kawkę, ale mam nadzieję, że podczas obrony Doktorant uzupełni tę lukę. W kolejnym rozdziale pracy doktorskiej Pana lek., mgr inż. Mateusz Kawka podsumował uzyskane przez siebie wyniki, które zostały szczegółowo opisane w czterech pracach oryginalnych. W pracy doktorskiej zawarte zostało również streszczenie w języku polskim i angielskim i wnioski, które są weryfikacją hipotez. Pan lek., mgr inż. Mateusz Kawka zamieścił również wykaz publikacji, które nie weszły w zakres pracy doktorskiej w liczbie 5 o łącznym współczynniku oddziaływania IF wynoszącym 19,071 co przekłada się na 590 punktów MEiN i sześciu doniesieniach zjazdowych. Dodatkowo Doktorant wymienił oprócz grantu PRELUDIUM 17, kolejnych 7 grantów naukowych, gdzie w 6 przypadkach był kierownikiem projektu, a w jednym badaczem.

Publikacje wybrane do pracy doktorskiej są spójne i doskonale pokazują kolejne innowacje wprowadzane w temacie immobilizacji korzeni *R. graeca* w celu uzyskania jak najwyższego poziomu aktywnych biologicznie naftochinonów ze szczególnym uwzględnieniem rinderolu. Ze względu na fakt, że publikacje te były już wnikliwie poddane procesowi recenzji (peer-review) w czasopismach, nie będę ich więc szczegółowo omawiać.

W swoich badaniach Doktorant wykorzystał szereg technik i metod jak: hodowla korzeni anatomicznych i włósnikowatych w kulturach *in vitro* z zastosowaniem immobilizacji oraz bez, analiza chromatograficzna z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami w celu rozdzielenia cząsteczek względem ich hydrofobowości (RP-HPLC), metoda HPLC-DAD-UV-VIS, analiza cytotoxycywności z wykorzystaniem testu MTT, cytometria przepływowa, test apoptozy przy użyciu aneksyny V i jodku propidyny, test potencjału błony mitochondrialnej, analiza morfologiczna jąder komórkowych z wykorzystaniem barwienia DAPI, hodowle *in vitro* komórek nowotworowych HeLa, skaningowy mikroskop elektronowy w celu scharakteryzowania morfologii testowanych materiałów użytych do immobilizacji masy roślinnej oraz spektroskopia fourierowska w podczerwieni (FT-IR) do analizy ich struktury chemicznej. Wszystkie zastosowane techniki przez Doktoranta doprowadziły do uzyskania bardzo cennych, wiarygodnych i interesujących wyników, które zostały prawidłowo zanalizowane, dobrze przedyskutowane z wykorzystaniem dostępnej literatury naukowej

i co najważniejsze dzięki opatentowaniu będą miały szansę na praktyczne wykorzystanie, co jest niezmiernie istotne z biotechnologicznego punktu widzenia.

Wartość merytoryczna przedstawionych rezultatów w rozprawie doktorskiej jest bardzo wysoka i ma potencjał aplikacyjny, a do najważniejszych osiągnięć naukowych według mojej opinii należy:

- ✓ Wykazanie że aerożel złożony z metylotrimetoksysilanu (MTMS) jest dwufunkcyjnym biomateriałem służącym do jednoczesnej immobilizacji korzeni włośnikowatych *R. graeca* i indukcji wytwarzania naftochinonów. Ponadto aerożel ten wykazuje wysoki poziom selektywnej adsorpcji lipofilowych naftochinonów wydzielanych zewnątrzkomórkowo, co pozwala na wydajną ekstrakcję *in situ* naftochinonów.
- ✓ Wykazanie, że zastosowanie makroporowatej pianki poliuretanowej (PUF) w celu zatrzymania biomasy korzeni *R. graeca* skutkuje uzyskaniem najwyższej produktywności naftochinonów tj. 653 µg/g suchej masy.
- ✓ Wykazanie, że zastosowanie makroporowatej pianki poliuretanowej w hodowli korzeni anatomicznych i transformowanych *R. graeca* skutkuje równomierną i stabilną syntezą rzadkiej lipofilowej pochodnej naftochinonu – rinderolu, którego zawartość po 42 dniach hodowli wynosi $222,98 \pm 10,47$ µg/kolbę.
- ✓ Wykazanie, że makroporowata pianka poliuretanowa może być z powodzeniem stosowana do usuwania *in situ* rinderolu z hodowli korzeni.
- ✓ Wykazanie, że zastosowanie monolitycznego makroporowatego kserożelu złożonego z metylotrimetoksysilanu (MTMS) w postaci zdezintegrowanej indukuje ponad 9-o krotny wzrost świeżej masy korzeni włośnikowatych *R. graeca* oraz najwyższą syntezę deoksyzikoniny (204,08 µg).
- ✓ Wykazanie, że modyfikacja ortokrzemianu tetraetylu (TEOS) w postaci modyfikacji organicznymi grupami funkcyjnymi (podstawnikami metylowymi i hydroksylowymi) zastosowana w hodowli korzeni transgenicznych *R. graeca* skutkuje zwiększeniem poziomu naftochinonów deoksyzikoniny i rinderolu oraz przyrostem biomasy roślinnej.
- ✓ Wyjaśnienie mechanizmu aktywności biologicznej rinderolu w komórkach raka szyjki macicy HeLa (indukcja programowanej śmierci komórkowej).

Rośliny stanowią niewyczerpane źródło różnorodnych związków (metabolitów wtórnych), które mogą być potencjalnie wykorzystane jako leki. Przykładem takiej rośliny jest *R. graeca* bogata w biologicznie czynne metabolity wtórne z grupy naftochinonów. Roślina ta jest rzadkim gatunkiem endemicznym rosnącym w górzystych terenach Grecji i od 1997 r. jest wpisana na Czerwoną Listę Roślin Zagrożonych IUCN. Z tego względu jedyną alternatywą pozyskiwania naftochinonów z *R. graeca* jest zastosowanie roślinnych kultur in vitro dzięki zjawisku totipotencji, czyli zdolności komórek roślinnych do dzielenia się i odtwarzania całego organizmu z pojedynczej komórki. Do produkcji metabolitów wtórnych szczególnie przydatne są transformacje komórek roślinnych przy użyciu wektora jakim jest *Rhizobium rhizogenes* (wcześniej *Agrobacterium rhizogenes*). Jest to G (-), tlenowa pałeczka, która ma zdolność do indukcji tworzenia korzeni włósnikowatych w zainfekowanych roślinach. Wirulencja tej bakterii związana jest z obecnością plazmidu Ri, którego fragment T-DNA (ang. *transferred DNA*) zawierający tzw. onkogeny, jest przenoszony i integrowany do komórek roślinnych w trakcie infekcji. Kultury korzeni włósnikowatych znalazły zastosowanie w produkcji roślinnych metabolitów wtórnych, ze względu na ich intensywny wzrost bez konieczności podawania egzogennych regulatorów wzrostu, a także w przypadku wyselekcjonowania odpowiednich linii, stały poziom produkcji metabolitów wtórnych dzięki wysokiej stabilności genetycznej. I takie właśnie rozwiązanie zastosował w swojej pracy doktorskiej lek. med., mgr inż. Mateusz Kawka. Dodatkowo zastosował on różne techniki dotyczące immobilizacji biomasy zarówno anatomicznych jak również transformowanych korzeni *R. graeca* w celu usuwania produktu (naftochinonów) in situ, jak również intensyfikację ich wytwarzania w roślinie. Takie biotechnologiczne podejście do problemu jest godne wyróżnienia.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana lek. med., mgr inż. Mateusza Kawki jest bardzo wartościowa i spójna oraz została zrealizowana z wykorzystaniem warsztatu metodycznego, do którego nie ma żadnych zastrzeżeń merytorycznych. Co więcej praca doktorska cechuje się nie tylko wysoką wartością naukową wnoszącą istotny wkład do rozwoju fitochemii i biotechnologii roślin, ale również zawiera istotny wkład praktyczny, czego dowodem jest uzyskany patent.

Podczas obrony pracy doktorskiej chciałabym poprosić Pana lek., mgr inż. Mateusza Kawkę o przedyskutowanie kilku zagadnień i rozwianiu kilku moich wątpliwości, które pojawiły się po lekturze pracy doktorskiej:

1. Czy Doktorant mógłby wskazać które kultury (korzenie anatomiczne, czy kultury korzeni włośnikowatych *R. graeca*) byłyby wydajniejsze w hodowli immobilizowanej z zastosowaniem bioreaktora?
2. Czy Doktorant próbował podwyższyć poziom naftochinonów stosując elicytory abiotyczne i biotyczne w połączeniu lub bez połączenia z immobilizacją? Jeśli nie, to jakie ewentualnie elicytory mógłby zaproponować?
3. Czy oprócz komórek nowotworowych HeLa badana była aktywność rinderolu w stosunku do komórek zdrowych jako kontrola?
4. Czy oprócz rinderolu badano również aktywność proapoptotyczną całego ekstraktu z *R. graeca* na komórkach HeLa?
5. Czy pędy i liście *R. graeca* są bogate w aktywne naftochinony, które badał Doktorant, czy związki te są akumulowane głównie w korzeniach?
6. Dlaczego do ekstrakcji lipofilowych naftochinonów używano metanolu, a nie na przykład chloroformu czy tetrahydrofuranu?

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lek. med., mgr inż. Mateusza Kawki stosowną nagrodą. Wyniki pracy doktorskiej zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych, a oświadczenia współautorów publikacji wskazują, że wkład Pana lek., mgr inż. Mateusza Kawki w powstanie 6 prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej oraz patentu jest znaczący szczególnie w kontekście badań biotechnologicznych i fitochemicznych. W trzech pracach jest on pierwszym autorem, w jednej pracy udział ma równorzędny z autorami z Politechniki Warszawskiej, a w dwóch pozostałych oraz w patencie ma najwyższy udział procentowy z Katedry i Zakładu Biologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego WUM. We wszystkich pracach jest wymieniany jako autor, który brał udział w koncepcji badań, wykonywania doświadczeń związanych z hodowlą *in vitro*, badaniami fitochemicznymi oraz pisaniem manuskryptów. Dodatkowo na uwagę zasługuje fakt, że praca doktorska była finansowana przez Narodowe Centrum Nauki projektu w ramach konkursu Preludium 17 „Mechanizm aktywności przeciwnowotworowej oraz biotechnologiczne otrzymywanie rinderolu - nowej pochodnej naftochinonu”, w którym Doktorant pełnił funkcję Kierownika. Wyniki uzyskane w ramach

realizacji pracy doktorskiej były również prezentowane w postaci plakatów na konferencjach naukowych w kraju i we Lwowie.

Wniosek końcowy

Uważam, że udział Pana lek., mgr inż. Mateusza Kawki w powstanie sześciu prac naukowych oraz patentu włączonych do rozprawy doktorskiej upoważnia mnie do stwierdzenia, że rozprawa doktorska Pana lek., mgr inż. Mateusza Kawki pt. „*Biotechnologiczne metody intensyfikacji biosyntezy aktywnych biologicznie naftochinonów w kulturach in vitro Rindera graeca (A. DC.) Boiss. & Heldr.*” spełnia warunki określone w art. 13 punkt 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595 i test jednolity Dz. U. 2016, pozycja 882, 1311).

Bez wątplenia rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, wykazuje wiedzę teoretyczną Doktoranta w dyscyplinie naukowej i jednoznacznie wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia przez niego pracy naukowej. Pan lek., mgr inż. Mateusz Kawka jest dojrzałym młodym naukowcem, który ma w swoim dorobku 11 publikacji i patent, co przekłada na 1050 punktów ministerialnych, Impact Factor 38,372 i index Hirscha 4. Uzyskanie 8 grantów naukowych i pełnienie w 7 z nich funkcji kierownika projektu świadczy o szerokich zainteresowaniach badawczych Doktoranta i jego naukowej dojrzałości.

W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana lek. med., mgr inż. Mateusza Kawkę do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Mając na uwadze wartość poznawczą i praktyczną zaprezentowanych przez Pana lek. med., mgr inż. Mateusza Kawkę badań, zastosowanie wielu narzędzi i metod badawczych, opublikowanie wyników badań w czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz patentu, wnoszę ponadto o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Z wyrazami szacunku,

KIEROWNIK
Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych



Prof. dr hab. inż. Aleksandra Królicka

