



Wrocław, 11.11.2024

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pod tytułem

BIOTECHNOLOGICZNE METODY INTENSYFIKACJI BIOSYNTETY AKTYWNYCH BIOLOGICZNIE NAFTOCHINONÓW W KULTURACH *IN VITRO* *RINDERA GRAECA (A. DC.) BOISS. & HELDR.*

przedłożonej

Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Autor rozprawy

mgr Mateusz Kawka

miejsce realizacji rozprawy – Katedra Biologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor: **prof. dr hab. Katarzyna Sykłowska-Baranek** - WUM

Promotor pomocnicza: **dr Irena Bubko** – Narodowy Instytut Leków

Przedstawiona mi do oceny na zlecenie Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, rozprawa doktorska pana mgr. Mateusza Kawki spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 roku poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.), a tym samym uprawnia do ubiegania się o stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Przedmiotem rozprawy jest bowiem oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, polegające na udowodnieniu zależności produkcji, akumulacji i uwalniania naftochinonów przez korzenie transformowane od innowacyjnych porowatych materiałów, tworzących aerożele oraz ustaleniu ich potencjalnej aktywności biologicznej pod kątem właściwości cytotoksycznych *in vitro*.

Ponadto, rozprawa prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie nauki farmaceutyczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, w szczególności w zakresie biotechnologii farmaceutycznej, fitochemii, analizy farmaceutycznej oraz podstawowych technik badania bioaktywności.

Rozprawę stanowi wydruk oraz plik elektroniczny PDF o tożsamej treści, o objętości 186 stron, stanowiący opracowanie sześciu opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, których współautorem jest pan mgr Mateusz Kawka oraz współautorskiego patentu polskiego na rzecz Politechniki Warszawskiej i Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Na następnych stronach przedstawiam uzasadnienie powyższej opinii.

Uwagi ogólne na temat problematyki podjętej w rozprawie oraz ocena układu pracy

Oceniana dysertacja, złożona w toku postępowania o nadanie stopnia doktora nauk farmaceutycznych, opiera się na sześciu opublikowanych wieloautorskich artykułach, z czego dwa mają charakter przeglądowy, a cztery są doświadczone. Do tego dochodzi patent polski za wynalazek polegający na zastosowaniu aerozeli krzemoorganicznych do proliferacji, immobilizacji oraz intensyfikacji produkcji i sekrecji wybranych metabolitów roślinnych w kulturach *in vitro*. Pan Mateusz Kawka jest pierwszym autorem w obydwu pracach przeglądowych (*Biul Wydz Farm WUM* – nr 1 i 2) oraz jednej z publikacji eksperymentalnych (*Int J Molec Sci* – nr 4 na liście). W trzech pozostałych (3, 5 i 6) artykułach i w patencie jest jednym ze współautorów, których jest od 5 lub 8, w tym promotor i promotor pomocnicza, a także autorzy z Politechniki, odpowiadający za część dotyczącą syntezy i charakterystyki polimerów. Oświadczenia współautorów nie budzą wątpliwości, co do istotnego i niezastąpionego udziału doktoranta w ich powstawaniu. Tym samym, kryterium umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych należy uznać za spełnione.

Tematyka rozprawy wpisuje się w aktualne i dość powszechne prądy w biotechnologii roślin leczniczych, a jednocześnie wykorzystuje innowacyjne materiały jako trójfunkcyjne podłoża – do immobilizacji organów, do ekstrakcji w ciągu procesu (*in situ*) oraz do stymulacji określonych szlaków biosyntezy. Elementem nowości jest połączenie unikatowego know-how w zakresie wysokoproduktywnych kultur endemicznego na terenie Grecji gatunku *Rindera graeca* (*Boraginaceae*) z wykorzystaniem możliwości produkcji aerozeli o zaprojektowanych właściwościach przez współpracujący zespół z Politechniki Warszawskiej. Dodatkowym atutem jest kolejna współpraca, z Narodowym Instytutem Leków (gdzie prowadzi badania promotor pomocnicza), która wskazała perspektywy związane z aktywnością farmakologiczną naftochinonów, otrzymywanych w opracowanych systemach hodowli dwufazowych.

W pracach przeglądowych zostały obszernie i przystępnie scharakteryzowane zarówno stan wiedzy, jak i perspektywy dotyczące zastosowań biotechnologii, w szczególności nie opartej na rekombinacji (inżynierii genetycznej), w badaniu i optymalizacji biosyntezy roślinnych metabolitów wyspecjalizowanych (produktów naturalnych), z nastawieniem na wykorzystanie w farmacji, ale także w innych obszarach gospodarki, inaczej roślinnych produktów naturalnych. W pierwszej z tych prac, podjęto rozważania na temat rodzajów technik hodowli *in vitro*, zwiększania skali, systemów hodowli komórek, tkanek i organów oraz ich przemysłowe zastosowania. W drugiej publikacji, bardziej szczegółowo opisano technologie pozyskiwania (odzyskiwania) pożądanego substancji z biomasy roślinnej, w szczególności wyprodukowanej metodami biotechnologii. Większy nacisk położono na funkcjonalność i praktyczne/przemysłowe znaczenie różnych technik ekstrakcji w biotechnologicznych procesach ciągłych, nazywanych ekstrakcją *in situ*. Publikacje te stanowią bardzo dobre wprowadzenie do zagadnień specyficznych, stanowiących podstawę części eksperymentalnej.

W pracach eksperymentalnych, zaprezentowano i przedyskutowano wyniki kolejnych cykli eksperymentów z wykorzystaniem kultur korzeni włośnikowych *R. graeca* utrzymywanych w płynnych pożywkach wytrząsanych z dodatkiem pływających krążków aerożelowych, względnie aerozeli rozdrobnionych. Motywem wiodącym tych badań jest obserwacja akumulacji typowych dla tego gatunku naftochinonów, strukturalnie spokrewnionych z ważnym produktem przemysłowym – szikoniną. Biotechnologiczna produkcja szikoniny stanowi koronny przykład

wykorzystania kultur *in vitro* pokrewnego gatunku *Lithospermum erythrorhizon* na skalę przemysłową. Co ciekawe, jeden z tych związków – rinderol, został po raz pierwszy wyizolowany z kultur *in vitro* właśnie przez prof. K. Sykłowską-Baranek, promotorkę pana mgr. Kawki, co przydaje rozprawie unikatowości na światową skalę.

Ocena celu pracy i metodologii badań służącej do rozwiązania podjętych problemów

W rozdziale 3. "Cel pracy", autor precyzyjnie formułuje zarówno zasadniczy cel pracy, jak i wyszczególnia hipotezy badawcze.

W tym miejscu mam uwagę krytyczną, bowiem uważam, że rozbijanie na siedem (7!) hipotez zweryfikowanych w toku badań, wygląda raczej jak sformułowane po uzyskaniu wyników główne wnioski, a nie pytanie badawcze, które powinno raczej określać problem, zagadnienie, czy pytanie naukowe, na które odpowiedź nie musi kończyć się wnioskiem pozytywnym. Tego trochę zabrakło. Jednakże, badania były w dużym stopniu technologiczne, więc nie podważa to naukowego charakteru rozprawy. Podobne zastrzeżenie mam do zwrotu, że celem pracy było zastosowanie technik biotechnologicznych itd. Zastosowanie technik mogłoby być sposobem osiągnięcia celu/weryfikacji hipotezy, ale samo w sobie nie powinno być określane jako cel badań. Badania naukowe powinny mieć na celu odpowiedzi na pytania „czy”, „co”, „jak”, „dlaczego?”, a jeśli są aplikacyjne to jeszcze „po co?”.

W związku z tym, należałoby na obronie, skupić te liczne „hipotezy” w maksimum dwóch (no, może trzech jeżeli osobno wymieni cytotoksyczność) punktach i sformułować je w formie pytań badawczych.

Pod względem metodologicznym, praca zasługuje na bardzo dobrą ocenę. Do osiągnięcia celów wykorzystano adekwatny i stabilny biotechnologiczny model badawczy, nowoczesne i skuteczne techniki ekstrakcji i analizy. Badania bioaktywności *in vitro* przeprowadzono rutynowymi testami na modelu komórkowym standardowej, komercyjnej linii komórkowej. Monitorowanie procesów biotechnologicznych przeprowadzono stosownymi metodami statystycznymi. Pan magister Mateusz Kawka udowodnił w ten sposób swoje szerokie kompetencje, skrupulatność i wielokierunkowe zdolności badawcze, niezbędne w naukach farmaceutycznych.

Krytyczne uwagi do omówienia zbioru powiązanych tematycznie publikacji i pytania do rozprawy

Oprócz wymienionych powyżej pozytywnych uwag o rozprawie, w opisie badań opublikowanych zauważone zostały także nieliczne uchybienia, z których ważniejsze są następujące:

- Już na stronie 10, zdanie otwierające drugi akapit „W przedstawionej rozprawie doktorskiej, na szczególną uwagę zasługują dwie z wymienionych technik.” brzmi jakby było częścią recenzji, a nie rozprawy. Jest to oczywiście tylko drobna stylistyczna niezręczność.
- Kolejna uwaga ma charakter terminologiczny, a właściwie leksykalny – chodzi o termin „konstrukt” używany wielokrotnie w znaczeniu produktu polimerowego – aerożelu. Być

może jest to żargon przyjęty w technologii polimerów (tak jak w języku angielskim „polymer construct”), ale żaden polski słownik ani inne źródło (w tym najpopularniejsze wyszukiwarki internetowe), nie podaje innego znaczenie niż termin psychologiczny. Chyba powinno się użyć słowa „konstrukcja”, względnie „materiał” albo „wyrób”.

- Podobnie, nie powinno się w kontekście hodowli na wytrząsarkach, mówić o korzeniach „unieruchomionych” na PUF, a raczej immobilizowanych albo po prostu umieszczanych.
- Czy w tytule sekcji 4) na stronie 17 opisu nie powinno być „indukuje” zamiast „indukcje”?
- Na koniec uwaga edytorska o spisie literatury (w opisie, rozdział 6), w którym niejednolicie stosowano tytuły czasopism, gdzieśgdzie w wersji pełnej, a czasem w formie skrótu, a kropkami lub bez. Nie jest to wielkie uchybienie, ale przy publikowaniu zwraca się na to uwagę więc i w opisie badań warto przypilnować.

Pytania, na które warto byłoby poznać odpowiedź na obronie to:

- Czy Autor mógłby zaproponować jakieś rozwiązanie problemu zawyżonej zawartości rinderolu i deoksyzikoniny w biomacie korzeni trzymanyh w zdeintegrowanym kserożelu?
- Czy rozważano, albo jeśli nie to dlaczego, zastosowanie buforu w eksperymentach z kserożelem funkcjonalizowanym grupami karboksylowymi lub aminowymi?
- W eksperymentach cytotoksyczności, powinno się podawać także molarność badanych substancji, szczególnie w odniesieniu do wybranych wzorcowych substancji cytotoksycznych o określonych mechanizmach działania na różne punkty uchwytu w szlakach apoptozy. Jeśli tego nie wykonano, proszę o wytłumaczenie bądź wskazanie jakie przyszłe badania powinny zaplanowane?
- W odniesieniu do wniosku nr 5 (strona 23), czy jest jakiś, choćby pośredni dowód na to, że istotnie było generowane wyższe ciśnienie kapilarne i jak miałyby to wpłynąć na poczynione obserwacje?

Pytania do publikacji 3 – Nowak i wsp. 2021:

- Sekcja 2.3. jaki sposób wykonano odkażenie (sterylizację) PUF? Jak przygotowano ekstrakty – np. proporcje materiału i rozpuszczalnika, temperatura, czas ekstrakcji itp?
- Sekcja 2.4 – brakuje dokładnego opisu gradientu, to znaczy czy było linearny od 60% do 80% B i czy faza ruchoma B także była zakwaszona? Ponadto, proszę o szczegóły pochodzenia wzorców pochodnych szikoniny oraz dane dotyczące kalibracji i walidacji metody. Czy to było tak samo jak w publikacji 4?
- W całym artykule trudno było się doszukać informacji, co to właściwie były za naftochinony – czy rinderol i deoksyzikonina tylko, czy suma wszystkich wykrytych, czy jeszcze inne?

Do artykułu 4 – Kawka i wsp. 2022 (nawiasem mówiąc, na str. 68 podano rok 2021).

- Czy powinno się w stosunku do zawartości używać terminu „productivity”, gdy mierzono jedynie ilość w $\mu\text{g}/\text{kolbę}$ – jest to raczej „content” lub „amount” – np. Figure 7 & 8.

- Ponadto, w doświadczeniu badającym cytotoksyczność, substancja referencyjna (CCCP) została wymieniona tylko w teście potencjału błon mitochondrialnych – a co z pozostałymi?
- W opisie metod statystycznych brakuje nazwy wykorzystanego oprogramowania.

Odnosnie artykułu 5 – Wierzchowki i wsp. 2022:

- Z tekstu wynika, że analizowano zawartość deoksyzikoniny, a co z rinderolem, nie było? Jeśli nie było, to jaka mogła być tego przyczyna?
- Odnosnie obserwacji o zwiększaniu akumulacji naftochinonu w biomasie z czasem hodowli – czy nie mogło to być spowodowane wysyceniem zdolności absorpcyjnej w strefie kontaktu? Czy można to jakoś sprawdzić?
- Dlaczego korzenie na fotografii z Figure 11, B1 są wyraźnie cieńsze niż na A1 i C1? Były takie, czy to kwestia powiększenia?
- W sekcji 4.4 podobnie jak w poprzednich publikacjach, brakuje informacji o parametrach ekstrakcji, przygotowaniu próbek analitycznych i warunkach chromatografii, jak również o oprogramowaniu statystycznym.

Odnosnie artykułu 6 - Wierzchowski i wsp. 2024:

- Poczynając od metodyki z powodu układu publikacji – te same pytania do przygotowania próbek i metody analitycznej – cytowana jest praca nr 5, gdzie też nie ma wystarczających szczegółów.
- Druga wątpliwość to użycie terminu „transgenic roots” – czy rzeczywiście zweryfikowano obecność funkcjonalnych genów pochodzących z innego organizmu, czy były to, tak jak w poprzednich pracach, korzenie transformowane wybranym szczepem *Rhizobium rhizogenes*?
- Pytanie o test zdolność sorpcyjnych – napisano, że nie testowano naftochinonów z powodu ograniczonej dostępności – a jeśliby wykorzystać szikoninę, której wszak nie brakuje?
- Jakie pierścienie aromatyczne w olejach roślinnych mają na myśli autorzy? Tokoferole?
- W sekcji 3.2.4. pisząc o dezintegracji (rozpadzie) korzeni, oparto się na obserwacjach morfologiczno-anatomicznych, czy tylko są to przypuszczenia?
- Czy zwracano uwagę na proporcje rinderolu i deoksyzikoniny, lub ewentualnie innych naftochinonów? Czy brano pod uwagę niestabilność naftochinonów, jako substancji aktywnych oksydoredukcyjnie?
- Jakie „nieodwracalne wiązania – irreversible bonds” mieli Autorzy na myśli na tronie 13 artykułu?
- Pytanie do obserwacji pH, czy była prowadzona w toku hodowli, czy tylko po 28 dniach? Proszę o przedyskutowanie, jeśli tylko po 4 tygodniach.

W końcu, pytanie wynikające z ciekawości, nie wypływające z zastrzeżeń do pracy – dlaczego nazwano rinderol właśnie tak (od rodzaju Rindera), choć według literatury był otrzymany po raz pierwszy z *Cynoglossum columnae*?

Najważniejsze osiągnięcia eksperymentalnej części pracy doktorskiej

- Opracowanie i optymalizacja metodyki kultur *R. graeca* z wykorzystaniem materiałów porowatych pod kątem przyrostu biomasy oraz produkcji głównych naftochinonów

- Udowodnienie stymulującego wpływu aerozeli o dużej porowatości (drobnych porach) na produkcję naftochinonów
- Wykazanie, że aerozele selektywnie wychwytyją i akumulują wydzielane naftochinony, co przyczynia się poprzez przesunięcie równowagi reakcji, do zwiększonej ich biosyntezy.

Wnioski końcowe

Wszystkie wyszczególnione powyżej uwagi krytyczne i niedoskonałości, dotyczą głównie sfery technicznej oraz biologicznej części badań na komórkach, więc są łatwe do wyjaśnienia na obronie. Nie zmieniają faktu, iż od strony wartości naukowej praca uzupełnia stan wiedzy w naukach farmaceutycznych, jest oryginalna i odznacza się wysokim poziomem innowacyjności. Dobrze zaplanowane oraz przeprowadzone były tak analizy, jak i eksperymenty, zaś treści, odnoszące się do wiedzy z literatury przedmiotu są wnikliwie i skrupulatnie przytoczone. Wszystko to zaowocowało rozprawą dostarczającą dużo nowych informacji i przydatną jako podstawa kontynuacji programu biotechnologii gatunku *R. graeca* oraz rozszerzenia zebranych doświadczeń na podobne badania z zastosowaniem matryc żelowych syntetyzowanych na Politechnice Warszawskiej, w zespole prof. Macieja Pilarka.

Doktorant wykazał się doskonałą znajomością technik roślinnych kultur *in vitro* oraz ekstrakcji, i analizy fitochemicznej. Ponadto, udowodnił swoje umiejętności w badaniach biologicznych na linii komórkowej, wskazując na możliwość oddziaływania substancji otrzymanej z hodowli *in vitro* na komórki, chociaż działanie zweryfikowano tylko na jednej, i to dość specyficznej linii, za to sięgając po dość wnikliwe badania mechanizmów apoptozy.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska, autorstwa pana mgr. Mateusza Kawki w pełni kwalifikuje się do przyjęcia przez Radę Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, zgodnie z wymogami odpowiednich przepisów (w tym art. 13 ust. 1 Ustawy z 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 roku poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.), określających warunki stawiane rozprawom doktorskim na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie rozprawy mgr. Mateusza Kawki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Ponadto, kierując się znakomitym poziomem badań, ich innowacyjnym charakterem oraz wnikliwością interpretacji zaprezentowaną w opisie publikacji, zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy.

Wrocław, 11. listopada 2024 r.



Signed by /
Podpisano przez:

Adam Jan
Matkowski

Date / Data:
2024-11-12 13:44