WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej
Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź
tel. 42 677 91 60

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Łódź, 31.08.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Marty Klimek-Szczykutowicz pt. „Kultury *in vitro Nasturtium officinale* R. Br. jako potencjalne źródło biologicznie aktywnych metabolitów wtórnych i biopierwiastków"

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum w Krakowie

Promotor rozprawy - dr hab. Agnieszka Szopa

Na rozprawę doktorską składa się cykl spójny tematycznie ośmiu wieloautorskich publikacji, w tym pięciu prac już opublikowanych w latach 2018-2020 i trzech prac poddanych procesowi recenzji. W dniu 27.07.2021 zostałam poinformowana e-mailowo przez Promotora, Panią dr hab. A. Szopę, o zaakceptowaniu dwóch prac, w *Plant Cell Tissue and Organ Culture* i *Molecules*, które były w recenzji. We wszystkich pracach Pani mgr Marta Klimek-Szczykutowicz jest pierwszym autorem, a w czterech z nich autorem korespondencyjnym wraz ze swoim Promotorem. Jak wynika z oświadczeń Doktorantki, Jej udział polegał na przeprowadzeniu poszczególnych eksperymentów - badań biotechnologicznych, analiz chromatograficznych, udziale w przeprowadzeniu badań biologicznych, udziale w opracowaniu, analizie i interpretacji wyników oraz pisaniu manuskryptów. Swój udział Pani magister oszacowała na 45-70%. Wśród oświadczeń Doktorantka nie zamieściła oświadczenia jaki był Jej udział w powstaniu publikacji VI.1 (*Polish Journal of Cosmetology, 2018*). Łączny współczynnik oddziaływania *Impact Factor* prac opublikowanych i zaakceptowanych wynosi 21,549 (punktacja MNiSW=637), a uwzględniając zaktualizowaną punktację wg *Journal Citation Reports* za rok 2020, 25,149. W skład rozprawy wchodzą dwie prace poglądowe, w tym jedna w czasopiśmie krajowym (*Polish Journal of Cosmetology, 2018*) oraz 6 oryginalnych prac doświadczalnych w czasopismach będących na liście *Journal Citation Reports*. Ponadto, wyniki badań zostały zaprezentowane przez Doktorantkę w formie ustnej prezentacji na 7 konferencjach krajowych i w formie posterów na 13 konferencjach krajowych i międzynarodowych, a także w postaci wykładu w ramach posiedzeń Krakowskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Botanicznego, Instytut Botaniki PAN w 2018 roku. Badania zrealizowane przez Panią magister możliwe były dzięki finansowaniu z tzw. „Projektów statutowych" w latach 2015-2020 oraz „Projektu własnego" w latach 2020-2021.

Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Rozprawę doktorską stanowi spójny tematycznie cykl prac odnoszący się do kultur *in vitro* *Nasturtium officinale* R. Br. Rozprawa doktorska składa się z kilku rozdziałów: Wprowadzenia (str. 14-25), Celu pracy (str. 26-28), Metodologii i uzyskanych wyników (str. 29-60), który jest merytorycznym podsumowaniem publikacji wchodzących w skład rozprawy (publikacje V.1.-V.6.), Podsumowania, oceny biotechnologicznej i wniosków (str. 282-293), Spisu tabel (str. 294) i rycin (str. 295), Piśmiennictwa (str. 296-306) obejmującego 141 pozycji literaturowych w głównej mierze z ostatnich dziesięciu lat, prawidłowo cytowanych w kolejności numerycznej oraz Streszczenia w języku polskim (str. 323-327) i angielskim (str. 328-332). Ponadto, do rozprawy załączone są kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy (str. 61-281) oraz oświadczenia Współautorów prac (str. 307-322). W pracy zamieszczono 7 Tabel i 10 Rycin. Większość fotografii została wykonana samodzielnie przez Doktorantkę. Rozprawę doktorską poprzedza opis dorobku Doktorantki i Jej aktywności naukowej. Rozprawę charakteryzuje bardzo staranne opracowanie, w którym pojawiają się jedynie pojedyncze błędy typu „literówki", np. str. 56 - wynków, str. 57 - mimkropędów. Praca jest poprawna pod względem formalno-językowym.

Ocena wyboru tematu rozprawy doktorskiej i celu pracy

We **wprowadzeniu** Doktorantka przedstawiła charakterystykę botaniczną i przynależność systematyczną *N. officinale*, występowanie oraz surowiec pozyskiwany z tego gatunku i jego działanie lecznicze. *N. officinale* (Brassicaceae) jest gatunkiem wodnym lub częściowo wodnym bardzo rzadko występującym naturalnie na terenie Europy. W Polsce jest częściowo zagrożony wyginięciem. Surowcem jest ziele, *Nasturtii herba*, które w Niemczech jest oficjalnie zaakceptowanym surowcem roślinnym stosowanym w fitoterapii. *Nasturtii herba* ma zastosowanie w leczenia nieżytu nosa i stanów zapalnych dróg moczowych. Ponadto, ekstrakty z ziela *N. officinale* znaleźć można w składzie kosmetyków do pielęgnacji cery tłustej, dojrzałej oraz skóry głowy. Gatunek ten ze względu na swoje cenne właściwości prozdrowotne, niską kaloryczność, bogaty skład chemiczny i walory smakowe może być składnikiem sałatek. Głównymi grupami metabolitów wtórnych charakterystycznymi dla *N. officinale* są glukozynolaty, izotiocyjaniany, związki polifenolowe (kwasy fenolowe, flawonoidy i proantocyjanidyny) oraz mono-, di-, tetra- i seskwiterpenoidy. Szczegółowy opis gatunku z uwzględnieniem składu chemicznego, właściwości leczniczych, kosmetycznych i fitoremediacyjnych został zamieszczony w publikacji IV.1., *Fitoterapia, 2018*. Ponadto, w publikacji VI.1., *Polish Journal of Cosmetology, 2018*, Doktorantka przedstawiła wykorzystanie *N. officinale* jako rośliny kulinarnej oraz jako składnik preparatów kosmetycznych, m.in. o działaniu przeciwstarzeniowym, rozjaśniającym skórę i przeciwtrądzikowym.

Doktorantka wyznaczyła kilka celów badań i precyzyjnie zaplanowała zadania badawcze, które konsekwentnie były realizowane. Cel pracy jest prawidłowo określony i umotywowany. Celem pracy było **wyprowadzenie kultur pędowych *N. officinale***, optymalizacja warunków ich hodowli (dobór odpowiednich regulatorów wzrostu, ich stężenia, czasu hodowli, długości fali światła LED, hodowla na agarowym lub płynnym podłożu w kolbach lub bioreaktorach okresowo-zalewowych, Plantform i Rita®) w celu pozyskania biomasy i metabolitów wtórnych. Ponadto, Doktorantka przeprowadziła liczne zabiegi biotechnologiczne (elicytację wybranymi związkami oraz egzogenną suplementację podłoża hodowlanego związkami o charakterze prekursorów biosyntetycznych) w celu zwiększenia biomasy i zawartości metabolitów wtórnych w materiale roślinnym pozyskanym z kultur *in vitro*. Podczas prowadzenia roślinnych kultur *in vitro* szczególnie ważna i kluczowa jest optymalizacja warunków hodowli w odniesieniu, zarówno, do produkcji biomasy, jak i związków biologicznie czynnych. Obok badań biotechnologicznych, Doktorantka przeprowadziła **badania fitochemiczne** (analiza jakościowa i ilościowa związków polifenolowych i glukozynolatów, analiza zawartości akumulowanych biopierwiastków oraz analiza całkowitej zawartości glukozynolatów, polifenoli, flawonoidów, barwników fotosyntetycznych i rozpuszczalnych cukrów), a także **badania aktywności biologicznej** (aktywność antyoksydacyjna, aktywność przeciwbakteryjna, aktywność przeciwzapalna oraz zdolność hamowania aktywności tyrozynazy) ekstraktów z pędów hodowanych *in vitro* lub ziela *N. officinale*.

Biorąc pod uwagę nakreślone przez Doktorantkę tło naukowe rozprawy, m.in. zagrożony wyginięciem gatunek, uważam, że cel badań podjęty przez Doktorantkę jest jak najbardziej uzasadniony nie tylko z punktu widzenia naukowego, ale też w przyszłości aplikacyjnego i wpisuje się w aktualny nurt poszukiwania nowych substancji pochodzenia roślinnego. Kultury *in vitro N. officinale* dzięki optymalizacji warunków hodowli pod kątem stymulacji endogennej produkcji aktywnych biologicznie metabolitów, poprzez zabiegi biotechnologiczne takie, jak elicytacja, dodatek prekursorów ze szlaku biogenetycznego metabolitów wtórnych, mogą być alternatywnym i wydajnym źródłem pozyskiwania surowca oraz bioaktywnych związków (glukozynolatów i związków polifenolowych), co daje potencjalne możliwości wykorzystania ich cennych właściwości biologicznych. Roślinne kultury *in vitro* mogą być prowadzone na dużą skalę w bioreaktorach, umożliwiają pozyskiwanie surowca z rzadkich i chronionych gatunków roślin, niezależnie od strefy klimatycznej czy pory roku oraz pozyskiwanie cennych, biologicznie aktywnych, różnorodnych metabolitów wtórnych wykorzystywanych w terapii licznych schorzeń.

Ocena metodologiczna i merytoryczna rozprawy doktorskiej

Doktorantka wykazała się znajomością **różnych metod badawczych** dzięki, którym zostały zrealizowane sformułowane cele badawcze. Pani mgr M. Klimek-Szczykutowicz przeprowadziła liczne doświadczenia o charakterze interdyscyplinarnym, a wyniki swoich badań przedyskutowała

z wynikami innych autorów. Zaplanowane bardzo szczegółowo, zarówno, badania biotechnologiczne, fitochemiczne i aktywności biologicznej były konsekwentnie realizowane w kolejnych doświadczeniach, które są przykładem bardzo praco- i czasochłonnych badań. **Z publikacji wynika znakomita organizacja pracy i bardzo dobre przygotowanie naukowe Doktorantki do badań.** Prace te charakteryzują się wysokim poziomem naukowym oraz dużą dojrzałością Pani mgr M. Klimek-Szczykutowicz na polu naukowym. Ponadto, Doktorantka wykazała się umiejętnością prowadzenia doświadczeń w zespole badawczym o czym świadczą liczne współprace z innymi ośrodkami naukowymi w kraju i za granicą.

Doktorantka, **wyprowadziła kultury pędowe *N. officinale*** (publikacja V.1. i V.6.), które hodowała w sumie na 27 wariantach agarowej (0,72% w/v) pożywki wg Murashige i Skoog'a (MS) zawierającej różne kombinacje regulatorów wzrostu. Kultury pędów hodowała także w płynnym, wytrząsanym podłożu MS uzupełnionym jedną z czterech cytokinin i jedną z trzech zastosowanych auksyn (publikacja V.1.). Wskaźnik wzrostu dla tych kultur, w optymalnych warunkach, wynosił 5 (30 dzień, 1 mg/L BA+1 mg/L NAA) lub 10,5 (20 dzień, 1 mg/L Zea+1 mg/L NAA), odpowiednio, dla kultury prowadzonej na agarowym i płynnym podłożu. W kulturach pędowych Doktorantka przeprowadziła analizę całkowitej zawartości glukozynolatów i kwasów fenolowych, która została porównana z zawartością tych metabolitów wtórnych w zielu rośliny macierzystej i stwierdziła, że **regulatory wzrostu wpływały na zawartość badanych metabolitów wtórnych** (publikacja V.1.). W kulturach pędów stwierdzono obecność 10 kwasów fenolowych z dominującym kwasem protokatechowym (132 i 138 mg/100g s.m.) i kwasem galusowym (53 i 61 mg/100g s.m.), natomiast w zielu zidentyfikowano 7 kwasów fenolowych z dominującym kwasem rozmarynowym (61,27 mg/100g s.m.). W tym miejscu poprosiłabym Doktorantkę o komentarz i wyjaśnienie ponieważ w rozprawie Doktorantka napisała (str. 33), że „Dominującymi pod względem ilościowym metabolitami były kwas ferulowy (maks. 38,44 mg/100 g s.m., 10 dzień hodowli, wariant 1 mg/L BA i 1 mg/L NAA, kultury wytrząsane), oraz kwas *p*-kumarowy (maks. 31,66 mg/100 g s.m., 10 dzień hodowli, wariant 1 mg/L BA i 1 mg/L NAA, kultury wytrząsane)." oraz (str. 34) „W ekstraktach z ziela rośliny macierzystej zawartość poszczególnych związków wahała się od 0,48 do 61,27 mg/100 g s.m.. Dominującymi ilościowo metabolitami były: kwas ferulowy (14,32 mg/100 g s.m.), oraz kwas galusowy (13,67 mg/100 g s.m.)."

Innymi czynnikami wpływającymi na wzrost kultur *in vitro* oraz produkcję związków biologicznie aktywnych może być światło (jego rodzaj i długość fali), zastosowanie różnego typu elicytorów lub suplementacja podłoży w prekursory szlaku metabolicznego. Dlatego też kolejne doświadczenia zaplanowane przez Doktorantkę są jak najbardziej słuszne i trafne.

Doktorantka, określiła także **wpływ długości fali światła LED** na wzrost pędów *N. officinale* na agarowym podłożu MS uzupełnionym NAA i BA (publikacja V.3.), które zostało wybrane, jako optymalne dla wzrostu pędów i biosyntezy metabolitów wtórnych. Z literatury wiadomo, że światło jest jednym z czynników wpływającym na wzrost roślinnych kultur *in vitro* oraz produkcję związków biologicznie czynnych. Doktorantka zbadała także wpływ światła LED bądź braku oświetlenia na akumulację glukozynolatów, związków polifenolowych, rozpuszczalnych cukrów i barwników fotosyntetycznych w kulturze pędów rukwi wodnej. Doktorantka stwierdziła, że **światło LED wpływało korzystnie na przyrost biomasy pędów, jak i całkowitą zawartość glukozynolatów**. Po zastosowaniu światła mieszanego RBY - 50% światła żółtego (λ=600, 630 nm), 35% czerwonego (λ=670 nm) i 15% niebieskiego (λ=430 nm) oraz RBG - 50% światła zielonego (λ=528 nm), 35% czerwonego i 15% niebieskiego zaobserwowano ponad 2-krotnie wyższe indeksy wzrostu (odpowiednio, 13,4 i 11,8), niż po zastosowaniu światła fluorescencyjnego i białego światła LED. Światło RBG wpływało także pozytywnie na całkowitą zawartość glukozynolatów (237,92 mg SIN/100g s.m.). Warunki oświetlenia LED nie miały znaczącego wpływu na produkcję związków polifenolowych i rozpuszczalnych cukrów oraz potencjał antyoksydacyjny kultur pędowych *N. officinale* (publikacja V.3.).

Doktorantka prowadziła także kultury pędów *N. officinale* w płynnym, wytrząsanym podłożu MS w kolbach Erelenmeyera bez regulatorów wzrostu (publikacje V.6.) lub uzupełnionym BA i NAA (publikacja V.4.). W publikacjach V.4. i V.6., Doktorantka zbadała **wpływ wybranych pierwiastków** (wapnia, chromu, miedzi, żelaza, litu, magnezu, selenu i cynku) (V.6.) oraz **elicytorów biotycznych** (ekstrakt drożdżowy w stężeniach 1 i 3 mg/mL) i **abiotycznych** (etefon w stężeniach 25 i 50 μM, jasmonian metylu i salicylan sodu w stężeniach 50 i 100 μM) (publikacja V.4.) na przyrost biomasy pędów *N. officinale* i produkcję metabolitów wtórnych. Doktorantka wykazała, **po raz pierwszy, wpływ wybranych makro- i mikroelementów i ich stężenia na produkcję glukozynolatów** (172,9 mg/100 g s.m., Ca w stężeniu 1 mg/L) oraz **kwasów fenolowych** (kwasu protokatechowego (96,58 mg/100g s.m., Fe w stężeniu 50 mg/L) i kwasu galusowego (68,59 mg/100g s.m., Cr w stężeniu 5 mg/L)) w wytrząsanych kulturach pędowych rukwi wodnej, a także ich zdolności do bioakumulacji pierwiastków. Najwyższą wartość Gi (*growth index*) (11,65) osiągały kultury hodowane w podłożu uzupełnionym jonami Li w stężeniu 50 mg/L.

Produkcja metabolitów wtórnych w roślinnych kulturach *in vitro* może być stymulowana poprzez zastosowanie różnych elicytorów biotycznych i abiotycznych, które wywołując stres w komórkach mogą modyfikować wzrost, rozmnażanie i funkcjonowanie roślin. **Zastosowanie elicytorów podczas hodowli pędów rukwi wodnej w płynnym, wytrząsanym podłożu**, w optymalnych warunkach, nieznacznie wpływało na wartość współczynnika Gi w porównaniu do pędów kontrolnych nietraktowanych elicytorami (Gi ok. 30) (publikacja V.4.). Zastanawiające jest

jednak dlaczego współczynnik ten był tak wysoki również dla kultury kontrolnej nietraktowanej elicytorami, ponieważ dla kultur rosnących w płynnym, wytrząsanym podłożu, o takim samym składzie regulatorów wzrostu, współczynnik wzrostu był ponad 4-krotnie niższy (publikacja V.1.). Całkowita zawartość glukozynolatów wzrastała po zastosowaniu salicylanu sodu (50 µM, 4 dzień) i jasmonianu metylu (50 µM, 1 dzień) osiągając wartość, odpowiednio, 320,6 mg/100 g s.m. i 298,36 mg/100 g s.m. Salicylan sodu powodował także wzrost poziomu barwników fotosyntetycznych w kulturze pędów *N. officinale*. Zastosowane elicytory wpływały również na wzrost zawartości kwasu ferulowego, *p*-kumarowego, rutozydu oraz glukonasturcyny i glukobrassycyny.

W kolejnych doświadczeniach, **w celu zwiększenia skali hodowli**, kultury pędów *N. officinale* Doktorantka prowadziła w komercyjnie dostępnych **bioreaktorach okresowo-zalewowych, Rita ®** (publikacja V.2.) oraz **Plantform** (publikacja V.5.). Bioreaktory tego typu charakteryzują się brakiem naprężeń mechanicznych i dobrą wymianą gazową. Po 20 dniach hodowli indeks wzrostu wynosił ponad 30 dla kultur hodowanych w bioreaktorze Rita® (publikacja V.2.) oraz 13,7 dla kultur hodowanych w bioreaktorze Plantform po suplementacji podłoża aminokwasem, L-tryptofanem (3,0 mM, dzień 10) (publikacja V.5.) i były to wartości wyższe, niż te uzyskane dla kultur pędów rosnących w płynnym podłożu w kolbach. Ponadto, w porównaniu do kultur wytrząsanych, w pędach hodowanych w bioreaktorze Rita® odnotowano także 1,5-krotnie wyższą całkowitą zawartość glukozynolatów (261,97 mg/100g s.m.) (publikacja V.2.).

W materiale pozyskanym z bioreaktora Rita® Doktorantka dokonała również analizy jakościowej i ilościowej glukozynolatów metodą UHPLC-DAD-MS/MS. Głównymi metabolitami wtórnymi były glukonasturcyna, glukobrassycyna i 4-metoksyglukobrassycyna. Stężenia tych dwóch ostatnich metabolitów były znacząco wyższe w kulturach pędów, niż w zielu *N. officinale*. Całkowita zawartość polifenoli była również wyższa w kulturach pędowych, niż w zielu rośliny macierzystej. Dominującym związkiem w ekstraktach z kultur *in vitro* po 20 dniach hodowli był rutozyd. Kwas ferulowy i kwas *p*-kumarowy akumulowane były w znacznie mniejszych ilościach (publikacja V.2.), niż w wytrząsanych kulturach pędów rosnących w kolbach (publikacja V.1.).

Dla kultur hodowanych w bioreaktorze okresowo-zalewowym Plantform po suplementacji podłoża jednym z dwóch aminokwasów, L-fenyloalaniną i L-tryptofanem (publikacja V.5.) Doktorantka zaobserwowała wzrost całkowitej zawartości glukozynolatów (269,2 mg SIN/100g s.m.), flawonoidów (1364,38 mg RE/100g s.m.) oraz polifenoli (1062,76 mg GAL/100g s.m.) i były to wartości wyższe, niż te uzyskane dla pędów hodowanych w bioreaktorze Rita® (publikacja V.5.). Fenyloalanina jest substratem w początkowych etapach szlaku fenylopropanoidowego

i wykorzystywana jest jako prekursor w biosyntezie, m.in. kwasów fenolowych i flawonoidów. Doktorantka wykazała wpływ egzogennej suplementacji podłoża hodowlanego wybranymi biosyntetycznymi prekursorami podczas hodowli pędów w bioreaktorze Plantform na zawartość rozpuszczalnych cukrów i barwników fotosyntetycznych, jak również wybranych metabolitów wtórnych, tj. glukonasturcyny, glukobrassycyny, 4-metoksyglukobrassycyny oraz kwasu *p*-kumarowego, kwasu ferulowego i rutozydu (publikacja V.5.). Warto również podkreślić, że zawartość 4-metoksyglukobrassycyny w kulturach pędów po suplementacji podłoża L-fenyloalaniną i L-tryptofanem była, odpowiednio, 3,0- i 1,5-krotnie wyższa w porównaniu do zawartości tego metabolitu w pędach hodowanych w bioreaktorze RITA®.

Celem rozprawy doktorskiej oprócz badań biotechnologicznych i fitochemicznych była także ocena aktywności antyoksydacyjnej (publikacje V.1.-V.6.), przeciwzapalnej (publikacja V.2.) i przeciwdrobnoustrojowej (publikacja V.2. i V.5.). Pędy uzyskane z kultur *in vitro* poddane różnym zabiegom biotechnologicznym, w celu zwiększenia biomasy i zawartości metabolitów wtórnych, wykazywały **aktywność antyoksydacyjną** w testach DPPH, FRAP, CUPRAC oraz QUENCHER-CUPRAC.

Działanie przeciwzapalne oznaczono w oparciu o testy *in vitro* hamowania aktywności enzymów 15-lipoksygenazy (15-LOX), cyklooksygenazy-1 (COX-1), cyklooksygenazy-2 (COX-2) i sekrecyjnej fosfolipazy A_2 ($sPLA_2$). Ekstrakt z pędów hodowanych w bioreaktorze Rita® wykazywał umiarkowane hamowanie 15-LOX i bardzo słabe hamowanie $sPLA_2$. Hamowanie aktywności COX-2 i COX-1 przez ekstrakt z kultur pędowych było wyższe lub porównywalne, jak przez ekstrakt z ziela lub ibuprofen (publikacja V.2.).

Badania aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej obejmowały szczepy bakterii Gram-ujemnych (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Helicobacter pylori* ATCC 43504, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i ATCC 27853), Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i ATCC 43300, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Propionibacterium acnes* PCM 2400 i PCM 2334 i *P. granulosum* PCM 2462) oraz szczepy grzybów (*Aspergillus niger* ATCC 16404, *Candida albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 90030, *Microsporum canis* szczep kliniczny, *Penicillum chrysogenum* ATCC 10106 i *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533) (publkacje V.2. i V.5.). Badania potwierdziły działanie przeciwbakteryjne w stosunku do bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus* i *S. epidermidis*) i Gram-ujemnych (*H. pylori*) ekstraktów z kultur bioreaktorowych i z ziela rośliny macierzystej. Działanie przeciwgrzybicze ekstraktu z pędów hodowanych w bioreaktorze Rita® stwierdzono w stosunku do szczepów grzybów, *T. mentagrophytes* i *M. canis* (publikacja V.2.).

Na rynku europejskim, w tym także polskim, dostępne są liczne preparaty kosmetyczne zawierające w swym składzie ekstrakty z *N. officinale* o działaniu, m.in. rozjaśniającym skórę i przeciwtrądzikowym. Dlatego też, jak najbardziej słuszne były badania Doktorantki mające na celu zbadanie zdolności hamowania aktywności tyrozynazy przez ekstrakty z pędów hodowanych w bioreaktorze Rita® lub ziela *N. officinale* (publikacja V.4.), jak również ocena przeciwbakteryjna ekstraktu otrzymanego z pędów hodowanych w bioreaktorze Plantform po suplementacji podłoża L-fenyloalaniną wobec szczepów bakterii z rodzaju *Propionibacterium* (*P. acnes* i *P. granulosum*) powodujących trądzik. Badania wykazały, że ekstrakt ten wykazywał znaczącą aktywność przeciwko tym bakteriom. Co ważne, ekstrakt nie wykazywał cytotoksycznego działania wobec prawidłowych komórek - fibroblastów ludzkich w zakresie stężeń 1,95-250 µg/mL (publikacja V.5.). Doktorantka wykazała także możliwość wykorzystania ekstraktu z kultur pędowych *N. officinale* w preparatach kosmetycznych przeciw przebarwieniom skóry. Ekstrakt w stężeniu 1250 µg/mL wykazywał podobną zdolność hamowania aktywności tyrozynazy, jak kwas kojowy (publikacja V.4.).

Powyższe wyniki pokazują, że kultury pędowe *N. officinale* mogą być wydajnym źródłem pozyskiwania materiału z kultur *in vitro* jako surowca, a także różnych metabolitów wtórnych. Wyniki badań Doktorantki mają istotne znaczenie naukowe, jak również mają charakter praktyczny.

Podsumowując, jestem pod ogromnym wrażeniem ilości przeprowadzonych doświadczeń, co z punktu widzenia biotechnologa jest naprawdę olbrzymim wyzwaniem. Dla mnie, jako recenzenta, ważne jest podkreślenie, że była to wręcz „benedyktyńska praca". **Należy podkreślić ogrom pracy jaki włożyła Doktorantka podczas badań, Jej pracowitość i wnikliwość, a także staranność przeprowadzonych doświadczeń.** Zastosowane metody badawcze są jak najbardziej prawidłowe. Uważam, że Doktorantka na tym etapie kariery naukowej jawi się jako świetny naukowiec, a tak doskonałe doświadczenie Doktorantka mogła zdobyć pracując w zespole Pani prof. dr. hab H. Ekiert i pod kierunkiem Pani dr hab. A. Szopy, znakomitych biotechnologów i fitochemików. Bez wątpienia mogę stwierdzić, że precyzyjnie i niezwykle ambitnie zaplanowane badania pozwoliły na realizację zamierzonego, głównego celu naukowego rozprawy doktorskiej, którym było określenie biosyntetycznego potencjału kultur *in vitro N. officinale,* jako atrakcyjnego modelu badawczego, co nie było zadaniem łatwym i świadczy o bardzo dobrej znajomości warsztatu badawczego i dobrym przygotowaniu naukowym Doktorantki. Zakres przeprowadzonych badań jest imponujący. Doktorantka potrafiła wyciągnąć najważniejsze wnioski z przeprowadzonych badań, co przy tak ogromnej liczbie uzyskanych wyników było szczególnie trudne. Niezmiernie miło mi było recenzować tak przemyślaną i na wysokim poziomie naukowym rozprawę doktorską. Widząc tak duży potencjał naukowy Doktorantki nie mam żadnych wątpliwości,

że rozprawa doktorska Pani mgr Marty Klimek-Szczykutowicz w pełni (a nawet i ponad) spełnia wymogi stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Autorka jednak nie ustrzegła się pojedynczych błędów, co przy tak olbrzymiej liczbie przeprowadzonych doświadczeń i opisywanych wyników było nieuniknione. Z obowiązku recenzenta muszę się odnieść do pojawiających się nieścisłości, które są minimalnym niedociągnięciem, nie wpływającym na wysoką wartość merytoryczną pracy:

- we wstępie brakuje nazwy polskiej gatunku choć Autorka podaje liczne nazwy tego gatunku w językach obcych. Nazwa ta pojawia się dopiero w Streszczeniu.
- str. 27 - Autorka zalicza *Propionibacterium acnes i P. granulosum* do bakterii Gram-ujemnych, są to bakterie Gram-dodatnie,
- str. 33 - „w materiale roślinnym" - zastąpiłabym „w zielu rośliny macierzystej",

- w Wykazie skrótów brakuje wyjaśnienia skrótu GAL,

- str. 40 - „Wyznaczony stosunek MBC/MIC dla ekstraktów z kultur prowadzonych w bioreaktorach wyniósł 2, powinno być „1-2",

- str. 49 - Doktorantka napisała, że „Badania zawartości barwników fotosyntetycznych w ekstraktach z elicytowanych kultur mikropędowych *N. officinale* wykazały istotne różnice." W przypadku dyskutowania istotności różnic brakuje poziomu istotności *p* i komentarza, jakie testy statystyczne zastosowano.

- str. 52 - „Najwyższą zawartość karotenoidów stwierdzono w przypadku Phe dodawanej w dniu 0 w stężeniu 0,5 mM, i była ona 2,9-krotnie wyższa w porównaniu z kontrolą. " - powinno być „w stężeniu 0,1 mM" (Tabela 3 i 4, publikacja V.5.),

- str. 55 - „*P. acnes* MBC w zakresie 4-8" - powinno być „MBC/MIC 8"oraz „*S. aureus* MBC 16" - powinno być „MBC/MIC >8",

- str. 287, Tabela 4 - „OS" - powinno być „SD",

- str. 284 - „1060,80 mg RE/100g s.m., 100 µM NaSA", powinno być „1131,33 mg RE/100g s.m., 100 µM NaSA",

- str. 285 - Autorka napisała, że „Najwyższe zawartości w kulturach mikropędowych *N. officinale* uzyskano dla związków polifenolowych w kulturach agarowych hodowanych na podłożu MS z 1 mg/L Zea i 1 mg/L NAA (Tabela 4)." - proszę sprawdzić czy zgadza się wartość w Tabeli 4

(str. 287) z wartością podaną w publikacji. Moim zdaniem najwyższą wartość dla związków polifenolowych uzyskano w pędach hodowanych w bioreaktorze Plantform, po suplementacji podłoża tryptofanem 3 μM, 10 dzień.

- wpływ światła na wzrost i produkcję metabolitów wtórnych w kulturach pędów Doktorantka badała z zastosowaniem fotoperiodu 16/8h światło/ciemność (publikacja V.3.). Pozostałe badania biotechnologiczne były przeprowadzone z zastosowaniem ciągłego oświetlenia lampami LED. Czas ekspozycji kultur na światło oprócz długości fali światła mógł być także czynnikiem wpływającym na uzyskane wyniki badań.

- w badaniach biotechnologicznych istotna jest optymalizacja warunków hodowli pod kątem produkcji metabolitów wtórnych, jak i przyrostu biomasy. Czytelniejsze byłoby przedstawienie wyników w odniesieniu do produktywności dla oznaczanych związków biologicznie aktywnych. Zatem, dla podsumowania uzyskanych wyników, proszę Doktorantkę podczas publicznej obrony o odpowiedzenie na pytanie „Jakie warunki prowadzenia kultur pędowych *N. officinale* są optymalne biorąc pod uwagę produktywność w odniesieniu do całkowitej zawartości glukozynolatów, polifenoli oraz dominujących metabolitów wtórnych?"

Podsumowanie i wniosek końcowy

Uważam, że temat rozprawy wpisuje się w aktualny nurt poszukiwania nowych surowców roślinnych zawierających związki aktywne biologicznie. Podjęty cel badań uważam za, jak najbardziej uzasadniony. Był on konsekwentnie realizowany podczas części eksperymentalnej, co przy tak licznie zaplanowanych doświadczeniach nie było zadaniem łatwym i świadczą o bardzo dobrej znajomości warsztatu badawczego i bardzo dobrym przygotowaniu naukowym Doktorantki. Wyniki badań Doktorantki są nowatorskie i niewątpliwie poszerzają wiedzę w dyscyplinie prezentowanej przez Doktorantkę. Uzyskane wyniki mają nie tylko znaczenie poznawcze, ale mogą mieć także w przyszłości znaczenie aplikacyjne w odniesieniu do nowych surowców roślinnych bogatych w związki aktywne biologicznie, które można wykorzystać w preparatach farmaceutycznych i dermokosmetycznych. Dorobek naukowy Doktorantki jest bardzo liczny i wartościowy. Publikacje naukowe charakteryzują się wysokimi wskaźnikach bibliometrycznymi. IF tych prac wynosi 25,149, punktacja MNiSW=637.

W mojej ocenie rozprawa doktorska spełnia wszystkie przyjęte ustawowo kryteria stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora wobec powyższego z pełnym przekonaniem wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki farmaceutyczne UJ CM w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Marty Klimek-Szczykutowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników i dorobek naukowy Pani mgr Marty Klimek-Szczykutowicz wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Ewa Skała

dr hab. n. farm. Ewa Skała, profesor UM w Łodzi