Łódź, 25.05.2022

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Pawła Kubicy

pt „Kultury *in vitro Verbena officinalis* L. jako model do badań nad akumulacją związków bioaktywnych oraz potencjalne, biotechnologiczne źródło ich pozyskiwania"

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum pod kierunkiem prof. dr hab. Haliny Ekiert

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Pawła Kubicy dotyczy jednego z ważnych i aktualnych kierunków współczesnej biotechnologii roślin. Celem tego kierunku badawczego jest ocena możliwości wykorzystania kultur *in vitro* do pozyskiwania materiału roślinnego z wysoką zawartością biologicznie czynnych metabolitów. Wybór kierunku badań uważam za trafny i w pełni uzasadniony. Aktualne dane piśmiennictwa wskazują, że kultury *in vitro* prowadzone w ściśle kontrolowanych warunkach mogą być wydajnym i stabilnym źródłem wysoko standaryzowanego surowca roślinnego. Wiąże się to jednak z koniecznością podjęcia wielokierunkowych, żmudnych badań, celem optymalizacji warunków hodowli i wyselekcjonowania najbardziej produktywnej kultury. Działania takie podjął mgr Kubica, a wybranym do badań obiektem była *Verbena offcinalis* L. - werbena lekarska, roślina zielna z rodziny *Verbenaceae*. Ziele tej rośliny wykazuje udokumentowane działanie lecznicze i jest wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym oraz kosmetycznym. Charakterystykę botaniczną badanego gatunku, skład chemiczny, struktury najważniejszych metabolitów, aktywność biologiczną ekstraktów z ziela werbeny z uwzględnieniem niektórych poznanych już mechanizmów działania i odpowiedzialnych za to związków przedstawił doktorant w pierwszej części rozprawy zatytułowanej „Wprowadzenie". W rozdziale wymienił również niektóre dostępne na rynku europejskim preparaty lecznicze i suplementy diety, których składnikiem jest ziele werbeny lekarskiej. Surowiec, wprowadzony do oficjalnego lecznictwa europejskiego w 2008 roku, pozyskiwany jest głównie z upraw lub rzadziej ze stanu naturalnego, a w przemyśle kosmetycznym, jak podaje doktorant, wykorzystywany jest m.in. lizat z komórek kalusa. Badania biotechnologiczne ograniczały się dotychczas do opracowania procedury mikrorozmnażania *V. officinalis*. Mgr Kubica, jako pierwszy, podjął badania nad uzyskaniem różnego typu kultur *in vitro* z tego gatunku rośliny i ocenił możliwości wykorzystania pozyskanego w ten sposób materiału roślinnego, jako źródła metabolitów o znanym lub spodziewanym działaniu biologicznym. Zakres badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej jest bardzo szeroki i obejmuje trzy główne obszary: badania biotechnologiczne, badania fitochemiczne i analityczne oraz ocenę aktywności biologicznej ekstraktów

z różnego typu kultur *in vitro V. officinalis.*

Pierwszym etapem prac biotechnologicznych było zapoczątkowanie i prowadzenie niezróżnicowanych kultur kalusowych i zawiesinowych werbeny lekarskiej. Zwraca uwagę olbrzymi nakład pracy, którą doktorant wykonał, aby ustalić warunki hodowli zwiększające przyrost biomasy i stymulujące procesy biosyntezy pożądanych metabolitów. Składały się na to liczne eksperymenty związane z wyborem odpowiedniego podłoża, rodzaju i stężenia regulatorów wzrostu, właściwych warunków oświetlenia, czasu trwania cyklu wzrostu i optymalizacji masy inokulatu w stosunku do objętości hodowlanego podłoża. Dalszym etapem było założenie organogennej kultury *V. officinalis* różnicującej mikropędy, którą doktorant prowadził jako kulturę agarową, płynną stacjonarną i płynną wytrząsaną. Kolejnym, całkowicie nowym osiągnięciem mgr Kubicy było zwiększenie skali hodowli i przejście od hodowli w naczyniach laboratoryjnych (pojemniki Magenta, kolby Elenmeyera) do hodowli w różnego typu bioreaktorach. Ustalono warunki wzrostu dla kultur zawiesinowych w bioreaktorze balonowym skonstruowanym wg projektu dr A. Kokotkiewicza i w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym. Ten drugi jest obecnie najczęściej wykorzystywanym typem bioreaktora dla przemysłowej produkcji metabolitów w kulturach zawiesinowych. Kultury mikropędów prowadzono w komercyjnie dostępnych bioreaktorach RITA i Plantform, pracujących w systemie okresowego zalewania biomasy pożywką. Wszystkie podstawowe parametry, stosunek *inoculum* do pożywki, czas zalewania, czas spoczynku i długość cyklu wzrostu zostały ustalone doświadczalnie.

Równolegle do badań biotechnologicznych realizowanym kierunkiem były badania fitochemiczne poświęcone analizie metabolitów wtórnych w otrzymanym *in vitro* materiale roślinnym. Materiał do badań był bardzo zróżnicowany i obejmował 8 rodzajów kultur *in vitro* o różnym stopniu morfologicznego zróżnicowania, rosnących w różnych warunkach, pochodzący z kultur stałych, płynnych i bioreaktorowych. Badania prowadzone były w ekstraktach z biomasy i z hodowlanego podłoża. Przedmiotem analizy były kwasy fenolowe, glikozydy fenylopropanoidowe, glikozydy irydoidowe, flawonoidy oraz składniki olejku eterycznego. Dla porównania wymienione wyżej grupy związków badano także w ekstraktach z ziela rośliny pochodzącej z gruntu. Identyfikację i analizę ilościową kwasów fenolowych, fenylopropanoidów, irydoidów i flawonoidów prowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym (HPLC-DAD). Dodatkowo, ekstrakty z kultur mikropędów i ziela rośliny badano na obecność fenylopropanoidów i irydoidów metodą ultrasprawnej chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas o ultrawysokiej rozdzielczości pomiaru czasu przelotu (UHPLC-hr-q-TOF/MS). Badania te wykonano w specjalistycznym laboratorium naukowym w Innsbruku.

W odróżnieniu od ziela rośliny, która wytwarzała glikozydy iridoidowe (werbenalinę i hastalozyd) oraz flawonoidy (skutelarynę i 7-O-glukuronid apigeniny) w kulturach *in vitro* werbeny, niezależnie

od stopnia zróżnicowania i warunków hodowli nie stwierdzono obecności tych związków. Wyniki doświadczeń wyraźnie wskazują, że dla stymulacji biosyntezy tych metabolitów wymagane są inne strategie biotechnologiczne niż te zastosowane przez doktoranta. Wszystkie testowane kultury charakteryzowały się zdolnością do biosyntezy glikozydów fenylopropanoidowych: werbaskozydu i izowerbaskozydu. Rozdział chromatograficzny (UHPLC-hr-q-TOF/MS) ekstraktów z kultur mikropędów i ziela werbeny wykazał dodatkowo obecność leukosceptozydu A i cistanozydu D oraz ich izomerów. Ze względu na brak wzorców tych fenylopropanoidów doktorant w dalszych badaniach ograniczył się do analizy ilościowej werbaskozydu i izowerbaskozydu. Zawartość tych związków w ekstraktach z testowanych kultur była kilkakrotnie wyższa niż w zielu werbeny. Ważną częścią badań był dobór odpowiedniego podłoża (Murashige i Skoog'a z dodatkiem 1 mg/L IBA i 1 mg/L BAP) i określenie wpływu warunków świetlnych (światło fluorescencyjne, światło LED: niebieskie, czerwone, kombinacja światła czerwonego i niebieskiego w proporcji, odpowiednio, 70% i 30%, a także brak światła), masy inokulatu (0,3; 0,6; 0,9 g/30 mL podłoża) oraz czasu trwania cyklu wzrostu (2, 3, 4 tygodnie) na proces przyrostu biomasy i dynamikę akumulacji glikozydów fenylopropanoidowych w kulturach kalusowych. Na podstawie wartości suchej masy, wskaźnika przyrostu suchej masy (GI), jak również zawartości metabolitów w biomasie, doktorant porównał wydajności testowanych typów kultur w odniesieniu do wzrostu i produkcji werbaskozydu i izowerbaskozydu. Doktorant ustalił, że więcej fenyloetanoidów było wytwarzanych w kulturach o niższym stopniu morfologicznego zróżnicowania. Osiągnięciem szczególnej wagi było wytypowanie spośród testowanych kultur, wysokowydajnej w odniesieniu do werbaskozydu, kultury zawiesinowej *V. officinalis*. Kultura była prowadzona w bioreaktorze mieszająco-napowietrzającym z objętością pożywki 1000 mL i wytwarzała w ciągu stosunkowo krótkiego bo 14-dniowego cyklu wzrostu 9,18 g werbaskozydu w 100 g suchej masy tj. ponad pięciokrotnie więcej niż ziele kwitnącej rośliny. Produktywność tej kultury liczona w mg/L/dzień dla werbaskozydu i izowerbaskozydu wynosiła, odpowiednio, 115,2 i 4,27. W rezultacie w oparciu o bioreaktorową kulturę zawiesinową *V. officinalis* opracowano system, który może być wykorzystany do biotechnologicznego pozyskiwania werbaskozydu na skalą większą niż skala laboratoryjna. Jest to nowym i ważnym, zarówno w aspekcie poznawczym jak i praktycznym, osiągnięciem doktoranta. Należy również pozytywnie ocenić skuteczność strategii wybranych przez doktoranta celem stymulacji biosyntezy glikozydów fenylopropanoidowych w kulturach *in vitro* werbeny.

Doktorant zajął się także analizą jakościową i ilościową fenolokwasów w ekstraktach z materiału *in vitro* i z ziela *V. officinalis*. Wszystkie testowane kultury wykazywały, choć w różnym stopniu, zdolność do biosyntezy kwasów fenolowych, ale ilości tych związków były niskie. Zwiększenie zawartości fenolokwasów w ekstraktach z kultury zawiesinowej doktorant osiągnął po ustaleniu odpowiedniej proporcji między masą *inoculum*, a objętością hodowlanego podłoża. Wyniki analizy jakościowej wykazały

szersze spektrum fenolokwasów w wyciągach z niezróżnicowanych kultur kalusowych i zawiesinowych (6 zidentyfikowanych fenolokwasów), w porównaniu z kulturami mikropędów (2 związki) i zielem rośliny macierzystej (3 fenolokwasy). We wszystkich ekstraktach głównymi składnikami był kwas ferulowy i protokatechowy. Ciekawych wyników dostarczyły badania olejków eterycznych. Znany jest fakt, że niezróżnicowane lub słabo zróżnicowane kultury kalusowe i zawiesinowe nie są wydajnym źródłem tej grupy związków. Doktorant słusznie zatem wybrał jako model doświadczalny kultury pędów werbeny. Kultury rosły na agarowym podłożu i w płynnych pożywkach, w komercyjnych bioreaktorach okresowo-zalewowych RITA i Plantform o objętości pożywki, odpowiednio, 200 mL i 500 mL. Skład olejków i zwartość głównych składników analizowano metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) i chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizującym (GC/FID). Najwyższą zawartość olejku (ok. 8 g/kg s.m.) porównywalną z zawartością olejku z ziela rośliny macierzystej uzyskano w pędach hodowanych w bioreaktorze Plantform po wydłużeniu czasu eksperymentu z 35 do 56 dni. Wiązało się to jednak z obniżeniem biomasy i produktywności kultury. Jakościowy skład olejku eterycznego wyodrębnionego z hodowanych *in vitro* pędów *V. officinalis* różnił się istotnie od składu olejku pozyskanego z ziela. W zielu dominował kwas heksadekanowy, linalol i anetol. W olejku z kultury pędów, obok kwasu heksadekanowego, głównymi składnikami były 1-okten-3-ol, alkohol benzylowy i alkohol fenyloetylowy, związki o znanych już właściwościach biologicznych. Nie można stwierdzić czy te związki będą miały istotne znaczenie dla działania biologicznego olejku eterycznego z kultur *in vitro V. officinalis*. Wyniki posiadają jednak dużą wartość poznawczą i zachęcają do dalszych badań.

Wprowadzenie po raz pierwszy gatunku *V. officinalis* do hodowli *in vitro* i otrzymanie różnego rodzaju kultur jest niewątpliwym osiągnięciem doktoranta. Połączenie badań biotechnologicznych ze szczegółowymi badaniami fitochemicznymi pozwoliło na ocenę zdolności biosyntetycznych otrzymanych kultur *in vitro*. Mgr Kubica ustalił, że analizowane metabolity akumulowane są w biomasie i nie są wydzielane do podłoża. Poprzez zwiększenie skali eksperymentu i optymalizację warunków hodowli doktorant uzyskał wysokoproduktywną kulturę zawiesinową rosnącą w bioreaktorze z mieszadłem mechanicznym, która wytwarzała wysokie, znacznie wyższe niż ziele rośliny macierzystej, ilości werbaskozydu i izowerbaskozydu. Rezultatem przeprowadzonych badań było także pogłębienie wiedzy na temat chemizmu badanego gatunku rośliny.

Uzupełnieniem badań biotechnologicznych i fitochemicznych były badania biologiczne, w których doktorant ocenił aktywność przeciwutleniającą, cytotoksyczną, antyproliferacyjną i przeciwbakteryjną metanolowych ekstraktów z biomasy z różnego typu kultur *in vitro V. officinalis*. Badania zostały wykonane testami *in vitro*. Wyniki porównywano z rezultatami dla równocześnie prowadzonych analogicznych testów

z wyciągami z ziela werbeny. Dla oceny aktywności antyutleniającej zastosowano kilka testów (DPPH, FRAP, Cuprac, Quencher-Cuprac i test określający chelatującą aktywność ekstraktów), uwzględniających różne mechanizmy działania antyoksydacyjnego. Oznaczono również całkowitą zawartość polifenoli w testowanych ekstraktach spektrofotometryczną metodą Folin-Ciocalteu. Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie wniosku, że wyciągi z kultur *in vitro* charakteryzują się wysokim potencjałem antyutleniającym szczególnie w zakresie redukcji wolnych rodników. Aktywność ta okazała się, zależnie od typu kultury, wyższa lub zbliżona do aktywności wyciągu z ziela werbeny i pozytywnie skorelowana z całkowitą zawartością polifenoli. Dalsze badania wykazały, zróżnicowaną cytotoksyczność ekstraktów *in vitro* w teście *Atremia salina* i aktywność antyproliferacyjną wszystkich testowanych wyciągów w stosunku do komórek ludzkiego nerwiaka zarodkowego SH-SY5Y. Działanie przeciwbakteryjne ekstraktów badano wobec 4 szczepów bakterii Gram-dodatnich i 8 szczepów bakterii Gram-ujemnych, określając najwyższe stężenie hamujące MIC i najniższe stężenie bakteriobójcze MBC. Bardziej wrażliwe na działanie wyciągów z kultur *in vitro* okazały sie bakterie Gram-dodatnie. Badania wykazały aktywność biologiczną testowanych wyciągów, a zaobserwowane różnice w działaniu ekstraktów z różnych typów kultur *in vitro* werbeny mogą mieć znaczenie przy wyborze odpowiedniego materiału roślinnego w zakresie właściwości antyutleniających, antyproliferacyjnych czy przeciwbakteryjnych.

Reasumując, recenzowana rozprawa doktorska mgr Pawła Kubicy zasługuje na wysoką ocenę merytoryczną. Praca jest bardzo obszerna, a zakres zrealizowanych badań bardzo szeroki, począwszy od założenia różnego typu kultur *in vitro V. officinalis*, poprzez jakościową i ilościową analizę głównych metabolitów, aż do określenia właściwości biologicznych wyciągów z materiału otrzymanego *in vitro* i porównania z działaniem wyciągów z ziela rośliny. Badania zostały właściwie zaplanowane, starannie wykonane w oparciu o nowoczesny warsztat analityczny, właściwie dobrany do realizacji założonych celów. Ważne jest także poparcie uzyskanych wyników odpowiednią liczbę powtórzeń i analizą statystyczną. Tematyka pracy jest wieloproblemowa i jej realizacja była możliwa z uwagi na współpracę macierzystego zakładu doktoranta z różnymi ośrodkami naukowymi w kraju i za granicą oraz dzięki doświadczeniu i osiągnięciom naukowym w dziedzinie biotechnologii roślin, promotora pracy prof. dr hab. Haliny Ekiert.

W trakcie czytania pracy nasunęło mi się kilka uwag odnośnie użytych przez doktoranta sformułowań i pytań, do których chciałabym, żeby doktorant się odniósł:

1. str. 17 – irydoidy nie należą do związków polifenolowych
2. str. 44 – jest niezgodność między tekstem a danymi zamieszczonymi w tabeli 7.
3. Wolałabym aby doktorant nie używał sformułowania „…. o różnym stopniu organogenezy" (str. 288) oraz „… o niższym stopniu organogenezy" (str. 65) w odniesieniu

do wykorzystywanych w badaniach kultur kalusowych i zawiesinowych.

4. Czy Autor ma jakieś własne przemyślenia co do przyczyny nieobecności irydoidów i flawonoidów w kulturach *in vitro V. officinalis*? Czy Autor mógłby zasugerować strategie, które mogłyby doprowadzić do biosyntezy tych metabolitów w badanych kulturach.

Są to drobne uwagi i nie mają żadnego wpływu na wysoką ocenę pracy doktorskiej mgr Kubicy.

Mocną stroną rozprawy doktorskiej mgr Kubicy jest fakt, że wszystkie uzyskane wyniki zostały już opublikowane. Doktorant jest współautorem sześciu prac oryginalnych i 3 prac poglądowych. Kopie prac zostały włączone do rozprawy doktorskiej. Publikacje poglądowe rozwijają tematykę przedstawioną we wstępie dysertacji, natomiast prace eksperymentalne dotyczą całej części doświadczalnej zawartej w rozprawie. Artykuły opublikowano w latach 2017-2022 w czasopismach indeksowanych, z wyjątkiem dwóch prac poglądowych. Sumaryczna wartość IF=23,535, punktacja MNiSW=602. Wszystkie prace są wieloautorskie. W siedmiu pracach mgr Kubica jest pierwszym współautorem, w jednej drugim i w jednej trzecim. W trzech publikacjach jest autorem korespondencyjnym. W załączonych oświadczeniach Autor swój procentowy udział w powstawaniu publikacji ocenia w zakresie 30-75%, podkreślając udział w prowadzeniu prac z zakresu hodowli *in vitro*, wykonywaniu analiz chromatograficznych, przygotowaniu materiału do badań, opracowaniu i interpretacji wyników oraz redagowaniu manuskryptu. Doktorant przedstawił również oświadczenia współautorów, z których wynika, że ich procentowe udziały w pracach wynosiły od 3% do 35%. Wszyscy współautorzy wyrażają zgodę na włączenie tych prac, jako części rozprawy doktorskiej mgr P. Kubicy.

Fakt tak dużej aktywności publikacyjnej jest raczej rzadko spotykany u doktorantów. Nadaje to wiarygodność i dużą wartość naukową uzyskanym wynikom, a także świadczy o pracowitości, zaangażowaniu i dojrzałości naukowej doktoranta.

Wniosek

Przedstawiona do recenzji praca wnosi trwały wkład w rozwój biotechnologii roślin leczniczych i w pełni spełnia wymagania stawiane dysertacjom doktorskim. Uważam również, że praca zasługuje na wyróżnienie. W związku z tym wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Pawła Kubicę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Halina Wysokińska

prof. dr hab. Halina Wysokińska