



dr hab. Janusz Niedojadło, prof. UMK  
Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń 19/05/2023

### Recenzja osiągnięć naukowych dr Tomasza Kowalczyka stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego

Oceny dorobku naukowego dr Tomasza Kowalczyka stanowiącego podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego dokonano na podstawie uchwały Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z dnia 21/02/2023 powołującej mnie na recenzenta w oparciu o ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t. j. Dz. U. z 2022 r., poz. 574, ze zm.). Przedstawione do oceny dokumenty są zgodne z zaleceniami Rady Doskonałości Naukowej i spełniają wymogi formalne.

#### Ocena osiągnięcia naukowego

Osiągnięciem naukowym przedstawionym do oceny przez dr Tomasza Kowalczyka jest cykl sześciu prac, które w postępowaniu habilitacyjnym zostały zebrane pod wspólnym tytułem „Roślinne kultury *in vitro* jako źródło wybranych metabolitów wtórnych o potencjalnym znaczeniu medycznym”. W skład osiągnięcia wchodzi jedna praca o charakterze przeglądowym i pięć prac oryginalnych, w których opisano wyniki badań przeprowadzonych przez Habilitanta. Wszystkie prace zostały opublikowane w stosunkowo krótkim czasie pomiędzy rokiem 2019-2022 w czasopiśmie specjalistycznych z listy Journal Citation Reports. Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływań (IF), zgodnie z rokiem opublikowania według listy JCR, wynosi 24.331, natomiast suma punktów MNiSW wynosi 590. Przywołane parametry naukometryczne w pełni uzasadniają wykorzystanie niniejszego osiągnięcia naukowego jako podstawy do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego. Wszystkie publikacje mają charakter prac wieloautorских. We wszystkich pracach Habilitant jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym. Na podstawie dostępnych deklaracji oraz udziale współautorów znajdujących się w artykułach można wywnioskować, że dr T. Kowalczyk był odpowiedzialny za formułowanie hipotez, analizę wyników i pisanie manuskryptów. W części eksperymentalnej zajmował się przygotowaniem materiału roślinnego pochodzącego z kultur *in vitro*, generowaniem wektorów, transformacją roślin, konstrukcją bioreaktora i analizą indukcji apoptozy. Wskazuje to na wiodący udział we wszystkich pracach wchodzących w skład osiągnięcia zarówno na etapie tworzenia koncepcji i hipotez oraz prac doświadczalnych.

Prace Habilitanta dotyczą „zielonej biotechnologii” zajmującej się opracowywaniem i stosowaniem środowiskowo przyjaznych rozwiązań, często stanowiących alternatywę dla tradycyjnych procesów w rolnictwie, ogrodnictwie, czy ochronie zdrowia człowieka. Przykładem



jest projektowanie roślin genetycznie modyfikowanych w celu poprawy smaku, zwiększenia odporności na szkodniki i choroby lub zwiększenia produkcji cennych dla człowieka związków. Wykorzystuje się technologię opartą na systemach biologicznych lub ich pochodnych do wytwarzania produktów i procesów o określonym zastosowaniu. Jednym z głównych nurtów w dzisiejszej biotechnologii roślin jest opracowania nowych, efektywnych źródeł metabolitów wtórnych potrzebnych dla zdrowia i gospodarki człowieka. Te zagadnienia podejmowane w osiągnięciu stanowią aktualne i jedno z ważniejszych celów współczesnych wyzwań nauk biologicznych. Z tego powodu uważam, że Habilitant podejmuje istotne zadania naukowe o dużym potencjale praktycznym.

W cyklu prac jako pierwszy jest prezentowany artykuł przeglądowy pt: Genetic Manipulation and Bioreactor Culture of Plants as a Tool for Industry and Its Applications, który doskonale wprowadza w temat osiągnięcia wskazując na najważniejsze zadania i zasługi biotechnologii roślin. Artykuł podsumowuje kluczowe badania z ostatnich dziesięciu lat dotyczące wykorzystania roślin transgenicznych jako ekologicznych biofabryk do produkcji metabolitów wtórnych i białek rekombinowanych w bioreaktorach. Równocześnie przedstawia obecny stan wiedzy dotyczący produkcji tych związków na skalę przemysłową oraz współczesne typy bioreaktorów. Jest to interesująca publikacja, stanowiąca doskonały przegląd literatury, która ukazuje potencjał i możliwości wykorzystania roślin transgenicznych jako efektywnych narzędzi w produkcji biologicznie czynnych substancji.

Druga i trzecia publikacja naukowa wchodząca w skład osiągnięcia przedstawia prozdrowotne działanie ekstraktów zawierających kwas betulinowy z *Menyanthes trifoliata*. Informacje o pozytywnym działaniu kwasu betulinowego czy betuliny na procesy zapalne, antyoksydacyjne czy nowotworowe znane są od wielu lat. Informacje na temat tego związku/ekstraktów były już znane z literatury i ludowych podań od XVIII wieku. Obecnie preparaty zawierające kwas betulinowy (KB) są ogólnie dostępne. Z tego punktu widzenia obie prace nie ujawniają informacji o nowej substancji czynnej, którą można zastosować w leczeniu chorób człowieka. Jednakże synteza chemiczna KB jest dość kosztowna dlatego istotnym wkładem prac jest opisanie nowego źródła pozyskiwania tego związku. W pierwszej z nich badano wpływ ekstraktów na linię komórek glejaka, który jest jednym z najtrudniejszych do leczenia nowotworów układu nerwowego. Autorzy skupiają się na związku zwrotnym między ekstraktami na indukcję apoptozy i zmianami w ekspresji genów związanych z tym procesem. Założenia pracy dotyczą niezwykle interesującego nurtu dotyczącego pozyskania kwasów fenolowych i terpenoidów z kultur *in vitro* i hodowli doniczkowych w celu poznania ich działania w komórkach nowotworowych oraz w ludzkich prawidłowych liniach komórkowych. Jednym z głównych wniosków z badań jest potwierdzenie cytotoksycznego działania ekstraktu z korzeni *M. trifoliata* na linii komórek glejaka. Wykazano, że ekstrakt z korzeni miał silniejsze działanie cytotoksyczne w porównaniu z ekstraktem z części nadziemnych roślin. Jednakże w tej i pozostałych pracach osiągnięcia podczas opisu wyników



wskazujących na silniejsze działania związków izolowanych z poszczególnych części roślin podawano stężenia całkowitego ekstraktu. W większości prowadzonych badań lepszy efekt był wynikiem mniejszej ilości podanego ekstraktu. Jednakże, gdyby dodatkowo znalazła się informacja o stężeniu kwasu betulinowego od razu byłaby zauważalna zależność wyniku od wyższej dawki substancji. Nie zaobserwowano natomiast działania toksycznego ekstraktu na zdrowe komórki astrocytów. Pomimo, że wpływ kwasu betulinowego na komórki glejaka był już kilkakrotnie opisywany przed rokiem 2019, za cenne uważam wyniki opisujące działanie ekstraktu na indukcję apoptozy w komórkach glejaka poprzez zmniejszenie potencjału mitochondrialnego i regulację ekspresji genów związanych z apoptozą, takich jak *Bcl-2*, *Bax*, *Cas-3* i *TP53* oraz zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M. W pracy porównywano ilość i skład ekstraktu pochodzącego z różnych części roślin jednakże zabrakło mi dyskusji dotyczącej skąd wynikają takie różnice i dlaczego w hodowlach *in vitro* korzenie produkują najwyższe ilości kwasu betulinowego. Poznanie tych informacji znacznie mogłyby poprawić efektywność uzyskiwania substancji antyrakowych metodami biotechnologicznymi. Dla pełnego poparcia wyników działania kwasu betulinowego na procesy nowotworzenia niezbędne byłoby także badania ujawniające rolę pozostałych składników ekstraktu w badanych zjawiskach.

Druga praca jest kontynuacją badań dotyczących prozdrowotnych właściwości ekstraktu uzyskanego z *Menyanthes trifoliata*. Tym razem Autor skupił się na wpływie wyekstrahowanych substancji na procesy zapalne oraz wzrost tolerancji na stres oksydacyjny w komórkach komórek śródbłonki żyły pępowinowej (HUVEC), które były stymulowane lipopolisacharydem (LPS) lub nadtlaniem wodoru. Badania wykazały po raz pierwszy, że ekstrakty z części nadziemnej i korzeni rośliny wykazują działanie przeciwzapalne poprzez zmniejszenie ekspresji genów kodujących cytokiny. Ektrakty *M. trifoliata* również wykazują działanie ochronne poprzez zmniejszenie poziomów reaktywnych form tlenu (ROS). Ekstrakt z korzeni rośliny wykazał silniejsze właściwości ochronne niż ekstrakt z części nadziemnej. Badanie wykazało również, że ekstrakty *M. trifoliata* chronią DNA przed uszkodzeniami indukowanymi przez ROS. Związki uzyskane z korzeni hodowanych w kulturach *in vitro* w porównaniu z częściami naziemnymi znacznie silniej wpływały na ekspresję genów związanych ze stresem oksydacyjnym tj. hemoksygenazy 1 (HO-1), kinonodehydrogenazy 1 (NQO1), czynnika jądrowego (NRF2), białka KEAP1 lub podjednostkę katalityczną ligazy kwasu glutaminowo-cysteinowego (GCLC). Miało to efekt ochronny poprzez zmniejszenie poziomu ROS w cytoplazmie i mitochondriach ujawnione za pomocą DCFDA oraz wskaźnika nadtlenu w mitochondriach (MitoSOX).

W pracy wykazano także udział ekstraktów z *M. trifoliata* w ochronie DNA. Podobnie jak w innych pracach naukowych, stwierdzono, że roztwory bogate w polifenole hamują wzrost poziomu rozpadu PARP, polimerazy która jest odpowiedzialna za proces ADP-rybozylacji i występuje powszechnie podczas uszkodzenia DNA. Podobnie, poziom fosforylowanego histonu H2A.X, innego wskaźnika uszkodzeń DNA, zmniejsza się pod wpływem badanych ekstraktów podobnie jak pod wpływem czarnej herbaty lub ekstraktu z *Camptosorus sibiricus*.



Kolejne zagadnienie pracy dotyczy bardzo aktualnego medycznego problemu. Poszukiwanie nowych związków przeciwbakteryjnych stało się niezwykle istotnym wyzwaniem z powodu rosnącej oporności patogenów na tradycyjne leki. W tym kontekście znaczącą rolę do odegrania mogą mieć substancje pochodzenia roślinnego. Badania te wykazały niestety jedynie umiarkowaną aktywność obu ekstraktów w stosunku do badanych szczepów bakterii i grzybów.

W następnej pracy w celu zwiększenia ilości kwasu betulinowego uzyskanego z roślinnych kultur *in vitro* dr T. Kowalczyk postanowił przeprowadzić transformację z użyciem *Agrobacterium rhizogenes*. Tym samym praca podejmuje interesujący wątek opracowania metod biotechnologicznych zwiększających ilość pozyskiwanych substancji leczniczych. Pierwszym etapem pracy było uzyskanie wektora zawierającego gen kodujący syntazę skwalenu, silny promotor, sekwencje poprawiające efektywność translacji oraz kasety białek reporterowych tj. fosfotransferazę higromycyny,  $\beta$ -glukuronidazę czy białko GFP. Pod względem naukowym tą część pracy oceniam wysoko, bowiem z danych literaturowych wynika, że są to pierwsze informacje dotyczące transformacji strączyńca tępolistnego. W artykule zastosowano wiele eksperymentów sprawdzających efektywność transformacji co uwiarygodnia technikę i uzyskane w późniejszych etapach rezultaty. Następnie przeprowadzono schemat doświadczeń bardzo podobny jak w poprzednich pracach zmierzających do wykazania efektów uzyskanych tą drogą ekstraktów na cytotoksyczność, ekspresję genów związanych z apoptozą, potencjał błony mitochondrialnej w linii komórek białaczkowych (NALM6). W części badań ekstrakty roślinne mieszano z dokсорubicyną, związkiem chemoterapeutycznym. Takie połączenie jak wiemy z danych literaturowych może zmniejszyć ogólnoustrojową toksyczność terapii przeciwnowotworowych, ponieważ pozwala na obniżenie stężenia toksycznego leku. Badania dostarczają obiecujących wyników dotyczących zawartości kwasu betulinowego i jego działania cytotoksycznego na komórki białaczki. Jednak konieczne są dalsze badania, aby w pełni zbadać zastosowania kliniczne i mechanizmy molekularne tych związków w terapii nowotworowej.

Kolejnym krokiem w uzyskiwaniu na skale przemysłową kwasu betulinowego było opracowanie przez dr T. Kowalczyka bioreaktora do hodowli korzeni *Senna obtusifolia*. Wskazuje to, że Autor stara się skomercjalizować swoje wyniki i wprowadzić produkt do masowej produkcji. Popieram w pełni ten kierunek badań. Na podstawie porównania hodowanych w 50 ml kolbie i 10-litrowym bioreaktorze wykazano odpowiednio 17 i 25-krotny wzrost biomasy korzeni. Jednakże w mojej ocenie wynik ten nie jest do końca miarodajny, ponieważ różnice mogą wynikać z prostej zależności dotyczącej ilości składników pożywki, czy objętości pojemnika hodowlanego przypadającej na masę materiału wyjściowego. W pracy nie znalazłem jednak analizy tych zależności. Aby w pełni przekonać się jak konstrukcja bioreaktora powoduje wzrost masy kultury korzeni należałoby porównać wyniki z bioreaktora z biomasą uzyskaną z hodowli w kolbie 10 litrowej z 2 l pożywki. Dodatkowe informacje dotyczące m.in. indeksu mitotycznego, gospodarki hormonalnej, czy stężenia tlenu mógłby się również przyczynić do udoskonalenia warunków



wzrostu korzeni. Dalsze badania z wykorzystaniem z linii SOPSS2 oraz SOA41 wykazały większą cytotoksyczność, hamowanie proliferacji, tworzenie kolonii oraz wpływ na poziom białek związanych z apoptozą w komórkach glejaka U-87 MG, ekstraktu pochodzącego z roślin transformowanych. Dodatkowo, dla ekstraktu SOPSS2 udowodniono silne właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze, podczas gdy aktywność przeciwwirusowa była porównywalna dla transformowanej i nietransformowanej linii roślin. Wyniki artykułu potwierdziły, że inżynieria metaboliczna poprzez manipulację szlakami metabolicznymi w hodowli transgenicznych roślin w większej skali w bioreaktorze może stanowić dobre narzędzie do zwiększania produkcji cennych metabolitów wtórnych, które znajdują szerokie zastosowanie w medycynie i przemyśle.

Następnie Habilitant sprawdził jaki ma wpływ elicytor - jasmonian metylu (MeJA) w stężeniu 100  $\mu\text{M}$  na hodowlę korzeni *Senna obtusifolia* oraz produkcję kwasu betulinowego. Badania ujawniły, że choć MeJA zmniejsza biomasę hodowli to analizowanego związku zmierzono więcej o ponad 20 %. Tak jak w poprzednich pracach skoncentrowano się na wpływie toksyczności uzyskanego ekstraktu na komórki nowotworowe, a także na indukcję apoptozy w tym fragmentację DNA, aktywności kaspazy 3/7 czy zmian potencjału błon mitochondriów. Pomimo, że sprawdzenie działania ekstraktów uzyskanych w pracach jest konieczne to można z dużym prawdopodobieństwem założyć, że niewielka zmiana warunków hodowlanych roślin nie wpłynie na ich aktywność komórkową. Z tego punktu widzenia powtarzanie podobnych testów oraz bardzo podobny opis wyników w cyklu prac jest mało nowatorskie. W tej pracy zastosowano nową technikę badania aktywności topoizomeryazy I, która jest celem klinicznym wielu potencjalnych leków przeciwnowotworowych, niestety Autor poświęca jej zaledwie 2 zdania w sekcji wyniki co nie wskazuje na istotne znacznie tego doświadczenia.

Podsumowując Autor wykazał, że jest specjalistą w biotechnologii i biologii molekularnej roślin a swoje kompetencje potrafi wykorzystać w opracowywaniu nowych źródeł związków stosowanych w medycynie. Przez zastosowanie różnych eksperymentów zwiększył efektywność uzyskiwania kwasu betulinowego oraz potwierdził jego rolę w indukcji apoptozy, hamowaniu podziałów komórkowych i ograniczeniu rozprzestrzeniania się mikroorganizmów chorobotwórczych. Wysoko oceniam zarówno wartość naukową, jak i potencjał praktyczny części osiągnięcia, która dotyczy badań nad dostosowaniem materiału roślinnego do analiz, transformacji niemodelowego gatunku roślin, wyprowadzenia linii korzeni włośnikowanych, czy konstrukcji bioreaktora. Mam nadzieję, że dr Tomasz Kowalczyk wykorzysta swoje umiejętności z zakresu inżynierii metabolicznej do dalszych poszukiwań nowych, istotnych metabolitów, które można zastosować w gospodarce i ochronie zdrowia człowieka. Wyniki badań w ramach tego osiągnięcia stanowią znaczący wkład w rozwój dziedziny nauki biologiczne. Jednak mam pewne wątpliwości co do wyboru badanego związku, którego właściwości lecznicze są od dawna znane i występuje on w suplementach dostępnych na rynku farmaceutycznym, oraz schematyczności badań, polegającej na sprawdzaniu



tych samych mechanizmów komórkowych (przy użyciu różnych narzędzi) bez modyfikacji badanej substancji czynnej. Zabrakło mi także dyskusji i eksperymentów zmierzających do wyjaśnienia powodów wzrostu ilości badanej substancji w poszczególnych częściach roślin, bioreaktorach czy układzie z elicytorem. Mimo to, te uwagi nie wpływają na ogólną ocenę osiągnięcia. Uważam, że prezentowany dorobek w pełni spełnia wymogi niezbędne do uzyskania stopnia doktora habilitowanego.

### **Ocena dorobku naukowego i pozostałej aktywności naukowej**

Dorobek naukowy dr Kowalczyka, oprócz osiągnięcia, obejmuje 46 prac naukowych o łącznym współczynniku oddziaływania (IF) wynoszącym 166,54 oraz sumie punktów MNiSW wynoszącej 3010. Indeks Hirsha całkowitego dorobku waha się od 13 do 16, w zależności od przyjętej metodologii. W mojej ocenie, takie parametry można uznać za wysokie na tym etapie kariery naukowej. Większość prac poza osiągnięciem również skupia się na pozyskiwaniu i badaniu możliwości zastosowania substancji pochodzących z różnych gatunków roślin w medycynie. Świadczy to o ustalonym profilu naukowym Habilitanta.

Dr Tomasz Kowalczyk w ramach swojej aktywności naukowej uczestniczył także w ok 50 konferencjach, niestety wygłosił tylko 3 referaty i to przed doktoratem. Jego aktywność naukowa jest również związana z członkostwem w dwóch krajowych i jednym międzynarodowym towarzystwie naukowym oraz udziałem w zespołach recenzentów trzech czasopism: International Journal of Molecular Sciences, Plants i Biomolecules. Dr Tomasz Kowalczyk pełnił również funkcję recenzenta w kilkunastu czasopismach naukowych o uznanej renomie.

Obecnie stawianym wymogiem osobom ubiegającym się o stopień doktora habilitowanego jest realizacja aktywności naukowej w więcej niż jednej uczelni, w szczególności zagranicznej (art. 219 ust.3 ustawy *prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20 lipca 2018). Habilitant jako aktywność spełniającą ten wymóg podaje: 1) sześciomiesięczny staż naukowy w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi w Zespole kierowanym przez prof. dr hab. Janusza Szemraja, oraz 2) pobyt Technologie Zentrum Dortmund w ramach realizowanego przez UŁ projektu „Profesjonalne kadry sektora B+R”. W mojej ocenie ten drugi pobyt nie spełnia warunków stawianych przez ustawę. Wynikiem stażu jest 8 wspólnych publikacji z czego 3 przed rokiem 2018. W żadnej z publikacji po roku 2018 nie znalazłem afiliacji dr Kowalczyka z laboratorium prof. Janusza Szemraja. Ponieważ współpraca była podjęta już przed stażem oraz brak afiliacji i informacji o zatrudnieniu w innym miejscu niż jednostka macierzysta trudno jednoznacznie ocenić aktywność naukową w więcej niż jednej uczelni dr Tomasza Kowalczyka. Związku z przedstawionymi faktami w mojej oceni Habilitant w minimalnym stopniu spełnia ten wymóg stawiany osobom ubiegającym się o stopień doktora habilitowanego.

### **Działalność dydaktyczna, organizacyjna oraz popularyzująca naukę**

Z dostarczonych dokumentów wynika, że istotną częścią aktywności dr. Tomasza Kowalczyka jest działalność dydaktyczna i popularyzatorska. Prowadził kilka przedmiotów zgodnie



zgodnie ze swoimi zainteresowaniami naukowymi na studiach I i II stopnia. Jego zaangażowanie w obowiązki dydaktyczne zostało kilkakrotnie ocenione przez studentów jako doskonałe. Był również promotorem prac licencjackich i magisterskich. Angażował się także w dodatkowe projekty związane z nauczaniem akademickim, takie jak opiekun podczas realizacji badań w ramach Studenckich Grantów Badawczych Uniwersytetu Łódzkiego. Za zapewnienie wysokiego poziomu procesu dydaktycznego i jakości kształcenia został nagrodzony przez Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego w latach 2020/2021. Habilitant uczestniczył również w promocji wiedzy na temat zielonej biotechnologii, nowoczesnej ochrony przyrody, izolacji kwasów nukleinowych oraz roślin jako fabryk leków, poprzez liczne przedsięwzięcia na swojej Uczelni oraz udzielanie wywiadów medialnych. Poświęcał także swój czas na zainteresowanie uczniów liceów biotechnologią. Wynika z tych dokumentów, że Habilitant skutecznie dzielił swój czas pomiędzy aktywnością naukową a liczne obowiązki dydaktyczne, organizacyjne czy popularyzatorskie.

#### **Wniosek końcowy**

Uważam, że osiągnięcie pt: Roślinne kultury *in vitro* jako źródło wybranych metabolitów wtórnych

o potencjalnym znaczeniu medycznym oraz pozostały dorobek naukowy dr Tomasza Kowalczyka wnoszą istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne. Wraz z realizowaniem aktywności naukowej w więcej niż jednej jednostce oraz uwzględniając aktywność dydaktyczną, organizacyjną i popularyzatorską spełnia wszystkie wymagania stawiane osobom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, określone ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t. j. Dz. U. z 2022 r., poz. 574, ze zm.). Związku z powyższym popieram nadanie dr Tomaszowi Kowalczykowi stopnia doktora habilitowanego w dyscyplinie nauki biologiczne.