



UNIWERSYTET ROLNICZY

im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Dr hab. inż. Emilia Bernaś, prof. URK
Katedra Technologii Produktów Roślinnych i Higieny Żywnienia
Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie
Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr Agaty Fijałkowskiej**
pt. **„Biotechnologiczne metody otrzymywania fortyfikowanego mycelium modrzewnika
lekarskiego w poszukiwaniu preparatów o działaniu profilaktycznym w chorobach
cywilizacyjnych”**

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej
na Wydziale Farmaceutycznym

Uniwersytetu Jagiellońskiego-Collegium Medicum w Krakowie
**pod kierunkiem prof. dr hab. Bożeny Muszyńskiej jako promotora
oraz dr inż. Agaty Krakowskiej jako promotora pomocniczego**

Podstawą formalną przygotowania recenzji jest pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego-Collegium Medicum w Krakowie prof. dr hab. Anny Wesołowskiej z dn. 26 czerwca 2023 roku z prośbą o sporządzenie oceny rozprawy doktorskiej mgr Agaty Fijałkowskiej pt. „Biotechnologiczne metody otrzymywania fortyfikowanego mycelium modrzewnika lekarskiego w poszukiwaniu preparatów o działaniu profilaktycznym w chorobach cywilizacyjnych”.

1. Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

Postęp cywilizacyjny, a więc szybki rozwój przemysłu, dynamiczna urbanizacja oraz przemiany życia społecznego przyczyniły się do powstania nowej grupy schorzeń tzw. chorób cywilizacyjnych. Choroby te mają zwykle charakter schorzeń przewlekłych, bowiem odznaczają się brakiem zakaźności, powolnym rozwojem i długookresowym przebiegiem. Są to głównie choroby układu krążenia, nowotwory, choroby układu oddechowego, otyłość,

cukrzyca, alergię oraz zaburzenia psychiczne. W przypadku tych schorzeń ważne są przede wszystkim działania prewencyjne, a wśród nich właściwa dieta bogata w antyoksydanty, składniki mineralne (m.in. Mg, Se, Zn), kwasy tłuszczowe z grupy n-3, witaminy z grupy B, witaminę D, glukany oraz inne substancje biologicznie aktywne.

Grzyby wielkoowocnikowe są cennym, ale wciąż jeszcze niedocenianym, źródłem wielu składników funkcjonalnych, chociaż ich właściwości lecznicze znane są już od tysięcy lat. Grzyby były, i nadal są, stosowane w tradycyjnej medycynie chińskiej i japońskiej. Właściwości terapeutyczne przypisuje się około 700 gatunkom grzybów, przy czym badania naukowe prowadzone w tym zakresie dotyczą przede wszystkim gatunków uprawnych, m.in. lakownicy lśniącej, twardziaka jadalnego, czy wrośniaka różnobarwnego, natomiast w niewielkim zakresie obejmują grzyby dzikorosnące, które często występują na ograniczonym obszarze i dodatkowo cechują się sezonowością występowania. Dodatkowym problemem w przypadku grzybów dzikorosnących jest także bardzo duże zróżnicowanie składu chemicznego owocników, zależne w dużej mierze od warunków wzrostu oraz rodzaju i składu podłoża. W związku z powyższym rozwiązanie problemu zaproponowane przez Doktorantkę polegające na wykorzystaniu metody biotechnologicznej do produkcji mycelium modrzewnika lekarskiego, znajdującego się na Czerwonej Liście gatunków zagrożonych w Polsce wyginięciem, uważam za bardzo trafne i ważne dla rozwoju dyscypliny nauki farmaceutycznej, bowiem pozwala ono na otrzymanie naturalnego produktu o wysokiej aktywności biologicznej i wystandaryzowanym składzie chemicznym, który oprócz przemysłu farmaceutycznego może z powodzeniem stanowić cenny dodatek do żywności podnoszący jej cechy funkcjonalne.

2. Ocena formalna rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pt. „Biotechnologiczne metody otrzymywania fortyfikowanego mycelium modrzewnika lekarskiego w poszukiwaniu preparatów o działaniu profilaktycznym w chorobach cywilizacyjnych” stanowi spójny tematycznie cykl pięciu publikacji, w tym dwóch prac przeglądowych oraz trzech oryginalnych prac twórczych, opublikowanych w latach 2020-2023. Prace zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym: Chemistry and Biodiversity (1 artykuł), Foods (1 artykuł), Scientific Reports (1 artykuł) oraz International Journal of Medicinal Mushrooms (2 artykuły). Sumaryczny IF cyklu, zgodny z rokiem publikacji, jest równy 15,761, zaś punktacja MEiN wynosi 390. W czterech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a w jednej drugim, co świadczy o jej wiodącym wkładzie w powstanie prac i dodatkowo podnosi wartość ocenianej rozprawy doktorskiej. W dokumentacji znajdują się oświadczenia współautorów Publikacji nr 5 (Effects of dietary supplementation with in vitro-cultivated arboreal medicinal mushrooms on long-term memory and anxiety-like behavior of male mice) potwierdzające udział doktorantki w jej powstanie, niestety brak jest analogicznych oświadczeń w przypadku pozostałych prac, ponadto nie podano procentowego udziału Pani mgr Agaty Fijałkowskiej w powstaniu każdej z prac stanowiących rozprawę doktorską. Zgodnie z oświadczeniami współautorów udział Doktorantki w powstaniu Publikacji nr 5 polegał głównie na zaplanowaniu i przeprowadzeniu badań eksperymentalnych, analizie statystycznej danych, napisaniu artykułu oraz współredagowaniu tekstu manuskryptu po recenzjach.

Oceniana praca obejmuje 85 stron maszynopisu. Na końcu rozprawy zostały zamieszczone kopie trzech z pięciu prac stanowiących rozprawę doktorską oraz streszczenia dwóch pozostałych. Rozprawa została podzielona na 6 głównych rozdziałów: Wstęp – 10 stron, Założenia i cele pracy – 2 strony, Materiał i metody – 24 strony, Wyniki – 22 strony, Dyskusja – 7 stron, Wnioski i podsumowanie – 2 strony oraz Bibliografia – 11 stron. Opracowanie zawiera także wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim - po 4 strony oraz spis fotografii, tabel i rycin. Układ pracy jest typowy dla prac eksperymentalnych. Forma pracy jest przejrzysta, a umieszczony na początku spis treści ułatwia czytelnikowi orientację i szybki dostęp do zagadnień zawartych w poszczególnych rozdziałach. Proporcje rozdziałów są rozsądne. Bibliografia zawiera 84 pozycje, w większości oryginalne i angielskojęzyczne.

3. Ocena merytoryczna rozprawy

Tytuł rozprawy jest zgodny z jej treścią.

Pracę rozpoczyna Wstęp, który wprowadza w tematykę rozprawy. Opisuje on przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat zagadnień opisanych w pracy, w tym problemów, z którymi boryka się współczesna farmacja i medycyna w zakresie chorób cywilizacyjnych, z naciskiem na zaburzenia afektywno-poznawcze i ich związek z zaburzeniami somatycznymi. Ponadto Doktorantka scharakteryzowała właściwości prozdrowotne i lecznicze modrzewnika lekarskiego, soplówki jeżowatej i boczniaka różowego, czyli gatunków grzybów, które były przedmiotem rozprawy. Rozdział ten został podzielony na 3 podrozdziały i jest dość obszerny. Ta część pracy napisana jest bardzo merytorycznie, w oparciu o odpowiednio dobraną literaturę, co świadczy o znajomości przez Autorkę literatury przedmiotu. Do napisania tego rozdziału Doktorantka umiejętnie wykorzystała informacje, jakie znalazły się w dwóch pierwszych publikacjach przeglądowych stanowiących rozprawę doktorską Pani Fijałkowskiej, w których w szczególności i bardzo merytoryczny sposób został scharakteryzowany modrzewnik lekarski (Publikacja 1) oraz inne gatunki grzybów o silnym potencjale prozdrowotnym (Publikacja 2). Do tego rozdziału mam tylko jedną uwagę. Moim zdaniem Wstęp powinien zostać skrócony do maksymalnie 2 stron maszynopisu, natomiast w zamian za to Doktorantka mogłaby wprowadzić dodatkowy rozdział pt. Przegląd literatury, w którym zawarłaby pozostałe informacje ze Wstępu.

W dalszej części Autorka sformułowała 3 założenia i 3 cele naukowe pracy, które obejmowały przede wszystkim ocenę aktywności i potencjalnej biodostępności biologicznej mycelium modrzewnika lekarskiego pozyskiwanego metodami biotechnologicznymi w aspekcie prewencji chorób cywilizacyjnych, analizę wpływu fortyfikacji solami cynku lub magnezu na aktywność biologiczną mycelium wymienionego gatunku grzyba oraz porównanie aktywności biologicznej modrzewnika lekarskiego z aktywnością dwóch innych nadrewnowych grzybów leczniczych - soplówki jeżowatej i boczniaka różowego.

W rozdziale trzecim Autorka scharakteryzowała materiał oraz zastosowane narzędzia i metody badawcze. Na podkreślenie zasługuje kompleksowe podejście Doktorantki do analizowanego problemu badawczego poprzez zastosowanie bardzo szerokiego wachlarza badań, począwszy od technik biotechnologicznych, przez techniki chromatograficzne, metodę PCR, FTIR, a skończywszy na badaniach z wykorzystaniem modelu zwierzęcego. Takie podejście do problemu dowodzi posiadania przez Panią mgr Agatę Fijałkowską szerokiej wiedzy na temat zagadnień poruszanych w rozprawie, dużych umiejętności analitycznych oraz

doskonale opanowanego warsztatu badawczego niezbędnego do prowadzenia badań w obszarze związanym z dyscypliną farmacja. W odniesieniu do tego rozdziału mam kilka pytań, do których chciałabym, aby Doktorantka ustosunkowała się w czasie obrony pracy doktorskiej:

- dlaczego materiał grzybowy przed suszeniem sublimacyjnym zamrażano w temp. -20°C , skoro samo suszenie prowadzono w temp. -40°C ? Jak powszechnie wiadomo, w celu zminimalizowania strat składników labilnych dąży się do maksymalnego skrócenia czasu zamrażania poprzez zastosowanie możliwie niskiej temperatury, najczęściej $< -35^{\circ}\text{C}$ (s. 26),
- w jakiej temperaturze prowadzono ekstrakcję związków bioaktywnych za pomocą metanolu oraz mieszaniny metanolu i dichlorometanu; czy pomiędzy poszczególnymi etapami ekstrakcji metanolem stosowano wirowanie, a jeśli tak, to jakie były jego parametry (czas, temperatura, rpm); jaki rodzaj urządzenia zastosowano do odparowania mieszaniny metanolu i dichlorometanu i jakie były parametry tego procesu (temperatura, czas); jakie było stężenie etanolu, w którym rozpuszczano materiał grzybowy (s. 28),
- dlaczego zastosowano różne czasy inkubacji próbek w przypadku oznaczania aktywności antyoksydacyjnej względem rodnika DPPH tzn. w przypadku próbek niepoddanych działaniu soków trawiennych czas ten wynosił 1 godzinę, a w przypadku materiału po trawieniu 20 minut? Należy zauważyć, że zastosowanie różnych czasów inkubacji uniemożliwia porównanie ze sobą otrzymanych wyników (s. 33),
- proszę o doprecyzowanie czy badania *in vivo* opisane w rozdziale 3.12 przeprowadzono z wykorzystaniem mycelium modrzewnika lekarskiego suplementowanego solami Mg i Zn, czy niesuplementowanego (s. 31-45).

Na kolejnych 22 stronach mgr Agata Fijałkowska przedstawiła uzyskane wyniki, które zostały opublikowane w trzech pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (Publikacje 3-5), a na kolejnych 7 stronach przedyskutowała je z literaturą źródłową. Doktorantka bardzo dobrze poradziła sobie z dyskusją uzyskanych wyników, co nie było łatwym zadaniem ze względu na mnogość obiektów badawczych oraz różnorodność i liczbę przeprowadzonych analiz. W mojej opinii uzyskane wyniki badań są istotnym osiągnięciem naukowym. Ważnym aspektem praktycznym jest uzyskanie przez Panią magister 2-krotne większej wydajności produkcji w przypadku zastosowania fortyfikacji mycelium modrzewnika lekarskiego solami Mg i Zn (Publikacja 4). Ma to ogromne znaczenie w przypadku chęci komercjalizacji uzyskanych wyników badań. Sposób zaprezentowania wyników jest z reguły poprawny, niemniej jednak mam kilka uwag do tytułów rycin. W przypadku rycin: 2, 3, 6-10 zbędnym jest umieszczanie w ich tytułach opisu uzyskanych wyników, gdyż tego rodzaju informacje powinny być zamieszczone w tekście rozprawy. W odniesieniu do tytułów rycin: 4, 5, 10-12, 15 i 16 zamiast sformułowania „Brak wpływu” poprawniej byłoby użyć sformułowanie „Wpływ”, a w przypadku ryciny 2 i 3 można by było rozważyć zmianę ich numerów na 2a i 2b, ponieważ dotyczą one tego samego badania, ale przedstawiają inne dane. Do tej części rozprawy mam jeszcze dwie inne uwagi, do których chciałabym, aby Doktorantka ustosunkowała się w czasie obrony pracy doktorskiej:

- Autorka wykazała, że aktywność antyoksydacyjna mycelium modrzewnika lekarskiego była wyższa niż owocników, natomiast stwierdzony poziom fenoli był niższy. Co mogło być przyczyną takiego zjawiska (Publikacja 3, s. 47)?
- Doktorantka zanotowała, że w wyniku ekstrakcji materiału grzybowego do sztucznych soków trawiennych aktywność antyoksydacyjna owocników obniżyła się w mniejszym

stopniu, niż mycelium niefortyfikowanego i fortyfikowanego solami Mg i Zn (całkowity zanik). Z czego mogło to wynikać (s. 67)?

Następnym rozdziałem rozprawy doktorskiej są Wnioski i podsumowanie. Doktorantka na podstawie przeprowadzonych badań sformułowała trzy wnioski, które w pełni odpowiadają założonym celom pracy.

Ostatnim rozdziałem rozprawy doktorskiej jest Bibliografia. Znaczącą jego część stanowią prace opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym z listy JCR. Zdecydowana większość prac pochodzi z ostatnich 10 lat – 61 pozycji (73%), co wskazuje na bardzo dobrą znajomość przez Autorkę aktualnej literatury przedmiotu. W przypadku tego rozdziału mam jedynie uwagę dotyczącą ujednolicenia sposobu podawania literatury źródłowej, szczególnie w przypadku prac wieloautorских, gdzie należy wymienić nazwiska wszystkich autorów danej publikacji, a nie tylko nazwisko pierwszego autora (np. Brandalise i wsp. 2017).

Streszczenie rozprawy doktorskiej, zarówno w wersji polskojęzycznej, jak i anglojęzycznej, obejmuje 4 strony maszynopisu oraz zostało podzielone na podrozdziały. Jest ono napisane poprawnie, niemniej jednak moim zdaniem wymaga ono skrócenia do maksymalnie 2 stron maszynopisu. W tej części pracy pojawiły się drobne nieścisłości: zamiast sformułowania „analiza mykochemiczna” lepiej użyć „analiza chemiczna”, oznaczenie względem DPPH należy zaliczyć się do analiz chemicznych (s. 5). Ponadto nie jest jasne w przeliczeniu na kg czego podawana jest dawka materiału, którym żywiono zwierzęta doświadczalne np. 100 mg/kg; czy chodzi o kg masy ciała zwierząt doświadczalnych, czy kg paszy (s. 5)? Proszę o komentarz w czasie obrony pracy doktorskiej.

Pozostałe uwagi:

- należy ujednolicić cytowanie literatury źródłowej w tekście rozprawy tzn. w przypadku co najmniej 3 autorów należy podać nazwisko tylko pierwszego autora, a pozostałych autorów jako „i wsp.” lub „i in.”.
- sformułowanie „faza ciekła” należy zastąpić sformułowaniem „faza ruchoma” (s. 32),
- wnioski i podsumowanie powinny być napisane w czasie przeszłym dokonanym,
- dla Recenzenta oczywistym jest, że ze względu na ograniczony dostęp publikacje 4 i 5 nie zostały zamieszczone w rozprawie doktorskiej, jednak moim zdaniem zamieszczenie jedynie samych abstraktów, szczególnie w przypadku części metodycznej, nieco utrudnia potencjalnemu czytelnikowi ocenę uzyskanych wyników. Rozwiązaniem tej kwestii mogłoby być dokładniejsze opisanie części metodycznej oraz wyników lub zamieszczenie w rozprawie doktorskiej tekstu obu publikacji w wersji autorskiej.

4. Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując, pomimo wskazanych drobnych uwag krytycznych, często o charakterze dyskusyjnym, uważam, że rozprawa doktorska mgr Agaty Fijałkowskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, świadczy o dojrzałości naukowej oraz umiejętności Doktorantki do prowadzenia badań naukowych. Seria publikacji składających się na rozprawę doktorską, obejmująca wyniki uzyskane w cyklu badawczym, pozwoliła stwierdzić, że mycelium modrzewnika lekarskiego pozyskiwanego metodami *in vitro* charakteryzuje się wysoką aktywnością biologiczną w odniesieniu działania antynowotworowego, immunostymulującego i przeciwłękowego. Pani mgr Agata Fijałkowska jest osobą bardzo

dobrze przygotowaną do prowadzenia samodzielnych badań, posiadającą wieloaspektową wiedzę z zakresu nauk farmaceutycznych oraz potrafiącą jasno przedstawić wyniki swoich obserwacji i prawidłowo sformułować wnioski. Potwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 187 sek. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.), dla kandydatów ubiegających się o nadanie stopnia doktora. Z powyższych względów **zwracam się do Członków Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego-Collegium Medicum w Krakowie o dopuszczenie mgr Agaty Fijałkowskiej do kolejnych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.**

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy oraz posiada szczególne walory poznawcze i aplikacyjne. Do realizacji założonych celów naukowych Doktorantka wykorzystwała różnorodne narzędzia badawcze (m.in. metody chemiczne, biologii molekularnej, *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych oraz *in vivo* na zwierzętach doświadczalnych), które wymagały od niej dużej wiedzy merytorycznej i ogromnego nakładu pracy. Kompleksowe podejście do problemu, jakim było pozyskanie owocników modrzewnika lekarskiego ze stanu naturalnego, następie hodowla mycelium w warunkach *in vitro* metodami biotechnologicznymi oraz ocena aktywności biologicznej otrzymanego materiału w zakresie jego potencjalnego działania przeciwnowotworowego, immunostymulującego oraz poprawiającego funkcje afektywne i poznawcze pozwoliły na uzyskanie wartościowych wyników, które zostały opublikowane w postaci trzech oryginalnych prac twórczych w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, posiadających IF i znajdujących się na Ministerialnej Liście Czasopism Punktowanych. Oprócz oryginalnych prac twórczych w skład rozprawy doktorskiej wchodzi dwie prace przeglądowe, także opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym i znajdujących się na Ministerialnej Liście Czasopism Punktowanych, co świadczy o dobrej znajomości przez Doktorantkę rozwiązywanego problemu. Sumaryczny IF wymienionych prac wynosi 15,761, zaś punktacja MEiN 390. W czterech z pięciu prac Doktorantka jest pierwszym autorem.

W związku z powyższym składam wniosek o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej, będącej podstawą postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki farmaceutyczne mgr Agacie Fijałkowskiej.

.....

Kraków, dnia 31.08.2023 r.

Dr hab. inż. Emilia Bernaś, prof. URK