

## O C E N A

**dorobku naukowego i osiągnięcia naukowego (rozprawy habilitacyjnej) pt.:**  
**„Wytwarzanie metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* *Leonurus sibiricus* L.**  
**oraz określenie ich właściwości biologicznych”**  
**oraz działalności dydaktycznej i popularyzatorskiej**  
**dr n. med. Przemysława Sitarka**  
**adiunkta**  
**w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej**  
**Katedry Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej**  
**Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

### **I. Część ogólna**

Pan dr Przemysław Sitarek jest absolwentem Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego (biologia, specjalność – biochemia). Studia na wymienionym Wydziale sfinalizował w 2008 roku obroną pracy magisterskiej pt.: „Polimorfizm genów biorących udział w metabolizmie estrogenów w raku i rozrostach endometrium”, wykonanej w Zakładzie Genetyki Molekularnej pod kierownictwem Prof. dr hab. Janusza Błasiaka.

Stopień naukowy doktora nauk medycznych (z zakresu – biologia medyczna, specjalność – genetyka) uzyskał w 2012 roku uchwałą Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, na podstawie pracy doktorskiej pt.: „Znaczenie ekspresji i polimorfizmów genów COX-2, LF, OSF-2 oraz MET dla patogenezы przewlekłego zapalenia zatok przynosowych z polipami nosa”, wykonanej w Zakładzie Chemii i Biochemii Klinicznej, pod kierunkiem dr hab. Ireneusza Majsterka, Prof. UM w Łodzi w ramach niestacjonarnych studiów doktoranckich.

W kwietniu 2013 roku został zatrudniony na etacie adiunkta w Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, w którym pod opieką naukową prof. dr hab. Haliny Wysokińskiej rozwinął badania z zakresu biotechnologii roślin leczniczych. Do chwili obecnej jest zatrudniony na etacie adiunkta w tej Jednostce.

### **II. Ocena aktywności naukowej**

Dorobek naukowy dr Przemysława Sitarka jest imponujący. Stanowi go 27 oryginalnych pełnotekstowych prac o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF=81,962 (punktacja MNiSW/KBN=718), jedna praca oryginalna opublikowana w czasopiśmie bez IF oraz jedna wysokopunktowana praca poglądowa w czasopiśmie z IF (IF=4,593, pkt. MNiSW=30). Łączna wartość IF=86,555, pkt. MNiSW/KBN=763.

Dorobek przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora stanowią 3 prace oryginalne opublikowane w czasopismach posiadających IF (IF=4,899) oraz 1 praca w czasopiśmie bez IF. Wszystkie pozostałe prace zostały opublikowane po obronie pracy doktorskiej.

Siedem oryginalnych prac składa się na osiągnięcie naukowe (IF=24,713, punktacja MNiSW/KBN=195).

Dorobek naukowy Habilitanta stanowią też komunikaty zjazdowe w liczbie 30, w tym 21 prezentowanych na konferencjach międzynarodowych organizowanych na terenie Europy

i w Chinach. Z wyjątkiem jednego komunikatu krajowego przed doktoratem, jest to dorobek uzyskany po obronie pracy doktorskiej.

Wszystkie prace oryginalne z wyjątkiem jednej opublikowanej w czasopiśmie bez IF (The Polish Otolaryngology) zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej, głównie takich jak: *Industrial Crops and Products, Molecules, Nutrients, Molecular Biotechnology, Plant Cell Tissue and Organ Culture, DNA and Cell Biology, Tumor Biology, Journal of Pharmacy and Pharmacology, Molecular and Cellular Biochemistry* i *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

W analizie dorobku zwraca uwagę wyraźnie wzmożona aktywność publikacyjna w 2016 r. (5 publikacji !), w 2017 r. (7 publikacji !!) i w 2018 r. (8 publikacji !!).

W analizie tej zwraca uwagę też aż 5 prac opublikowanych w czasopiśmie *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Można zazdrości Habilitantowi możliwości opublikowania tych pięciu prac (w tym dwóch stanowiących osiągnięcie naukowe) w wysokopunktowanym, lecz płatnym czasopiśmie.

W analizie bibliometrycznej zwraca uwagę fakt, że 21 prac (w tym 20 prac oryginalnych, nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego), to generalnie prace wieloautorskie (liczące od 3 do aż 14(!) Autorów). Najliczniejszą grupę stanowią prace, w których figuruje od 3 do 8 Autorów (łącznie 16 prac). Deklarowany udział Habilitanta w tych wieloautorskich pracach waha się od 45 do 70% (prace opublikowane przed doktoratem) i odpowiednio od 10 do 50% (prace po obronie doktoratu). Na pierwszoautorskie prace oryginalne Habilitanta przypada  $IF=8,464$  (90 pkt. MNiSW/KBN).

Łączna liczba cytowań wszystkich prac wynosi 115, a indeks Hirscha=8; dane wg bazy ISI Web of Science z dnia 13.12.2018 r. Wartości te wg bazy Scopus wynoszą odpowiednio: liczba cytowań – 155, indeks Hirscha=9.

Habilitant nie odbył naukowych staży zagranicznych. Jednak niezbędne obycie w międzynarodowym środowisku naukowym zdobył uczestnicząc w międzynarodowych konferencjach naukowych. Były to konferencje naukowe w Coimbrze, Girne (turecka część Cypru), Patras, Pizie, Grenadzie, Antalyi, Bolonii, Lizbonie, Ciëncii i w Szanghaju. Konferencje te były doskonałą okazją do zaprezentowania cząstkowych wyników badań oraz do promocji macierzystego Zakładu i równocześnie całego Wydziału.

W tej części analizy zwraca uwagę wyraźnie wzmożona aktywność w roku 2017 (6 prezentacji) i w roku 2018 (9 prezentacji !!).

Habilitant może poszczycić się też współpracą naukową z kilkoma ośrodkami zagranicznymi: dwa ośrodki z USA (Philadelphia, Charleston) oraz ośrodki z Francji (La Rochelle), Portugalii (Lisbon) i Włoch (Rome).

Habilitant był kierownikiem 1 projektu badań własnych dla młodych naukowców w latach 2015-2017 (Nr 502-03/3-012-01/502-34-0545), aktualnie jest kierownikiem kolejnego projektu własnego dla młodych naukowców 2017-2019 (Nr 502-03/3-012-01/502-34-032). Uczestniczył też w realizacji badań statutowych (Nr 503/3-012-01/503-31-001). Problematyka naukowa tych projektów związana jest z biotechnologią roślin leczniczych i produkcją bioaktywnych związków w roślinnych kulturach *in vitro* (transformowanych i nietransformowanych genetycznie) oraz badaniami aktywności biologicznej ekstraktów z biomasy uzyskanej *in vitro*.

Jednak pierwsze badania naukowe Habilitanta były związane z biologią medyczną i genetyką. Dotyczyły one badań nad polimorfizmem genów odpowiedzialnych za rozwój różnych chorób. W ramach pracy magisterskiej Habilitant badał polimorfizm genów biorących udział w metabolizmie estrogenów w raku i rozrostach endometrium.

Kolejne badania tego typu, realizowane już w ramach pracy doktorskiej dotyczyły polimorfizmu genów odpowiedzialnych za rozwój polipów nosa u pacjentów z współtowarzyszącą astmą lub alergią oraz u pacjentów bez współtowarzyszących wymienionych chorób. W trakcie realizacji tych badań, Habilitant miał okazję zapoznania się z metodyką badawczą z zakresu genetyki, biochemii i biologii molekularnej.

Te pierwsze prace Habilitanta stanowiły doskonałe przygotowanie merytoryczne do kolejnych etapów badawczych w Jego karierze naukowej.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych, zainteresowania naukowe Habilitanta były skupione na biotechnologii roślin leczniczych, lecz z wyraźnym ich powiązaniem z badaniami z zakresu genetyki, biologii molekularnej i biochemii oraz z badaniami aktywności biologicznej ekstraktów z biomasy uzyskanej *in vitro*.

Również osiągnięcie naukowe (rozprawa habilitacyjna) Habilitanta, które stanowi cykl siedmiu oryginalnych publikacji reprezentuje ten „po-doktorski” ważny kierunek badań. Dotyczy bowiem szeroko zaplanowanych biotechnologicznych badań *Leonurus sibiricus* L. – Serdecznika syberyjskiego, gatunku charakterystycznego dla flory Chin, Korei, Japonii, Kambodży oraz wschodniej Syberii, Ałtaju i Mongolii, które zmierzają do zaproponowania typu kultury *in vitro* tego gatunku z „wysoką” zdolnością produkcji związków fenolowych aktywnych biologicznie. Badania te próbują także wyjaśnić mechanizmy aktywności biologicznej ekstraktów z biomasy z kultur *in vitro* na poziomie molekularnym.

Cały pozostały (poza osiągnięciem naukowym) dorobek Habilitanta w dużym zakresie związany jest ze scharakteryzowaną powyżej „po-doktorską” problematyką naukowo-badawczą. Problematyka części prac dotyczy prób wyjaśnienia patomechanizmów wybranych chorób i ich genetycznych uwarunkowań.

Bardzo cennymi osiągnięciami w dorobku naukowym Habilitanta po uzyskaniu stopnia naukowego doktora o charakterze wyrażnie aplikacyjnym (nie tylko poznawczym), poza habilitacją, są:

- wyniki badań dotyczących oceny zmienności genetycznej w różnych typach kultur *in vitro* 3 gatunków roślin leczniczych: *Rhaponticum carthamoides*, *Harpagophytum procumbens* i *Rehmannia glutinosa*.
- wyniki badań nad wyjaśnieniem mechanizmów indukowania apoptozy w komórkach glejaka ludzkiego przez ekstrakty z kultur korzeni *Leonurus sibiricus* (kultury nietransformowane i transformowane genetycznie);
- wyniki badań właściwości biologicznych ekstraktów z kultur korzeni *R. carthamoides* (kultury nietransformowane i transformowane genetycznie), dotyczące aktywności antyoksydacyjnej i przeciwnowotworowej (indukcja apoptozy);
- wyniki badań biologicznej aktywności (właściwości przeciwdrobnoustrojowych, przeciwzapalnych i antyoksydacyjnych) olejków eterycznych z kultur korzeni *R. carthamoides* nietransformowanych i transformowanych genetycznie;
- wyniki badań nad potencjalną toksycznością flawonolignanów (m.in. obecnych w *Silybum marianum*) na płytki krwi i komórki nowotworowe. Wykazano brak efektu cyto- i genotoksycznego na badane komórki, równocześnie udokumentowano działanie ochronne na mitochondria oraz zmniejszenie liczby spontanicznych uszkodzeń DNA;

- wyniki badań nad przewlekłą obturacyjną chorobą płuc i wpływem palenia tytoniu na zmiany w układzie oddechowym i krwionośnym. Udowodniono m.in., że stosunek monocytów do dużych płytek krwi może być wykorzystany jako cenny parametr do wykrywania zatorowości płucnej u pacjentów. Wykazano także, że krótki okres palenia tytoniu wpływa na ekspresję genów i równowagę oksydacyjną komórek krwi, co może prowadzić do rozwoju przewlekłej obturacyjnej choroby płuc;
- wyniki badań nad związkiem między ekspresją genów (POSTN, IL-4 oraz IL-13), a rozwojem polipów nosa. Udowodniono, że wzrost poziomu ekspresji wymienionych genów może być związany z rozwojem przewlekłego zapalenia błony śluzowej nosa i zatok przynosowych;
- wyniki badań dotyczących porównania profili ekspresji i metylacji 6 genów kodujących białka biorące udział w naprawie DNA. Wykazano m.in. istotne statystycznie zmiany w profilach ekspresji genów u osób zdrowych oraz pacjentów z rozwiniętą chorobą Alzheimera.

Przedstawiony szeroki, imponujący zakres prowadzonych przez Habilitanta badań był możliwy dzięki Jego umiejętności współpracy z pracownikami naukowymi licznych jednostek naukowych zagranicznych i krajowych.

Wśród jednostek, z którymi współpracował Habilitant zwracają uwagę te zagraniczne: Lewis Katz School of Medicine at Temple University i Fels Institute for Cancer Research & Molecular Biology (Philadelphia), The Medical University of South Carolina (Charleston), University of La Rochelle (La Rochelle), Campus Bio-Medico University and Teaching Hospital (Rome) oraz 2 ośrodki zlokalizowane w Lizbonie – Universidade Lusofona's Research Center for Biosciences and Health Technologies i Research Institute for Medicines (University of Lisbon).

Współpraca Habilitanta dotyczy również kilku placówek naukowych zlokalizowanych na terenie Łodzi: Laboratorium Genetyki Medycznej, Katedry Biochemii Ogólnej, Katedry Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin, Katedry Fizjologii i Biochemii Roślin (jednostki Uniwersytetu Łódzkiego), Instytut Podstaw Chemii Żywności (jednostka Politechniki Łódzkiej) oraz jednostek macierzystego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – Zakładu Immunopatologii oraz Kliniki Pneumonologii i Alergologii I Katedry Chorób Wewnętrznych.

Inna formą aktywności naukowej Habilitanta, świadcząca o Jego znacznej pozycji naukowej są recenzje prac eksperymentalnych wykonane przez Niego w latach 2014-2018 dla takich czasopism z listy filadelfijskiej, jak: *Molecules*, *Medical Science Monitor*, *Journal of Ethnopharmacology*, *International Journal of Molecular Sciences*, *Tumor Biology*, *3 Biotech*, *Industrial Crops & Products*, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *International Journal of Nanomedicine*, *Saudi Journal of Biological Sciences*, *World Journal of Surgical Oncology*, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* (łącznie 16 recenzji).

O zainteresowaniach naukowych Habilitanta świadczy Jego członkostwo w Polskim Towarzystwie Biochemicznym i w Polskim Towarzystwie Genetycznym.

Habilitant dbał o podnoszenie swoich kwalifikacji zawodowych, czego dowodem jest Jego uczestnictwo w szkoleniu „Healthy Ageing Research Centre” (2014 r.).

O bardzo wysokiej ocenie aktywności naukowo-badawczej Habilitanta świadczą liczne, jak na Pracownika o zaledwie 7-letnim stażu pracy nagrody naukowe - zespołowe (łącznie 10 nagród !!!), przyznane Jemu i Współautorom prac przez J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (w latach 2012/13-2017/18). Są to Nagrody Zespołowe

I Stopnia (2012/13, 2016/17 – 2 nagrody, 2017/18 – 2 nagrody), Nagrody Zespołowe II Stopnia (2012/13, 2014/15, 2016/17, 2017/18) i Nagroda Zespołowa III Stopnia (2014/15).

### **III. Ocena osiągnięcia naukowego (rozprawy habilitacyjnej)**

Oceniane osiągnięcie naukowe obejmuje cykl siedmiu oryginalnych pełnotekstowych publikacji, powiązanych tematycznie. Powstały one w okresie zaledwie 3 lat (2016-2018). Dwie prace zostały opublikowane w 2016 r., kolejne dwie w 2017 r., a w roku 2018 Habilitant opublikował kolejne trzy prace. Badania z zakresu biotechnologii roślin wzbogacone o badania z zakresu genetyki, biochemii, fitochemii i badania aktywności biologicznej należą do trudnych, czasochłonnych i ryzykownych. Habilitantowi można zatem pogratulować niezwyklej aktywności naukowej, determinacji i niezłomnego entuzjazmu naukowego.

Wszystkie prace stanowiące osiągnięcie naukowe zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, z listy filadelfijskiej, posiadających współczynnik oddziaływania IF, w zakresie od 1,81 do 4,936 (2 prace w *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* i pojedyncze prace w: *Tumour Biology*, *Molecular Biotechnology*, *Neurochemical Research*, *Industrial Crops & Products* i w *Molecules*) Sumaryczna wartość IF wynosi aż 24,713 (195 pkt. MNiSW/KBN) i jest dowodem wysokiej oceny uzyskanych przez Autora wyników badań.

Z zamieszczonych w materiałach „postępowania awansowego” kopii tych publikacji wynika, że we wszystkich siedmiu pracach Habilitant jest pierwszym autorem. Ze względu na interdyscyplinarny charakter prowadzonych prac eksperymentalnych i potrzebę współpracy z innymi ośrodkami naukowymi wszystkie prace są wieloautorskie (od 5 do 11 Autorów!). Z dołączonych oświadczeń Współautorów oraz z oświadczeń Habilitanta wynika, że pełnił w nich znaczącą rolę. Brał udział w zaplanowaniu i realizacji badań eksperymentalnych, w opracowaniu wyników oraz w przygotowaniu publikacji w ostatecznej formie. W dokumentach nie znalazłam jednak informacji o procentowym udziale Habilitanta w powstaniu prac tworzących osiągnięcie naukowe.

Przedłożone do oceny osiągnięcie naukowe tworzą prace już opublikowane (uprzednio recenzowane i zaakceptowane), zatem poniższa ocena eksponuje ich walory poznawcze, nowatorski charakter oraz potencjalną aplikacyjność uzyskanych wyników badań.

W ramach ocenianego osiągnięcia naukowego Habilitant prowadził badania o charakterze interdyscyplinarnym łączące badania z zakresu biotechnologii roślin, genetyki, biochemii, biologii molekularnej, fitochemii i badania biologicznej aktywności ekstraktów roślinnych.

#### **Celem ocenianego osiągnięcia naukowego było:**

- uzyskanie potomnych roślin *Leonurus sibiricus* z pędów zregenerowanych *in vitro*;
- uzyskanie i selekcja linii kultur korzeni nietransformowanych i transformowanych genetycznie tego gatunku (tzw. kultur „hairy roots”);
- uzyskanie i selekcja linii kultur korzeni transformowanych z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1;

- przeprowadzenie oznaczeń ilościowych i identyfikacji związków fenolowych produkowanych w różnych typach kultur *in vitro* *L. sibiricus*;
- przeprowadzenie analizy olejków eterycznych w materiale z kultur *in vitro*;
- przeprowadzenie badań aktywności biologicznej wodno-metanolowych ekstraktów z biomasy z kultur *in vitro* *L. sibiricus* obejmujących m.in. działanie przeciwdrobnoustrojowe, antyoksydacyjne, cytotoksyczne.

Mimo znacznego już doświadczenia w roli recenzenta niezmiernie trudno mi wyselekcjonować najbardziej wartościowe wyniki pracy habilitacyjnej (osiągnięcia naukowego) Habilitanta. Zdecydowała zatem przedstawić krótko całość wyników badań. Kłopoty z wyborem najcenniejszych wyników związane są głównie z faktem, że zdecydowana ich większość (niemal wszystkie !), to wyniki niezwykle oryginalne o nowatorskim charakterze, łączące elementy biotechnologii roślin z biologią medyczną.

Cenne wyniki badań Habilitanta uzyskane w ramach pracy habilitacyjnej (osiągnięcia naukowego), to:

- Otrzymanie potomnych roślin *L. sibiricus* z pędów zregenerowanych *in vitro*. Przeżywalność roślin po 6 miesiącach po przeniesieniu do warunków *in vivo* wynosiła ok. 90%;
- Wyniki analiz fitochemicznych ekstraktów z pędów zregenerowanych roślin. Udowodniono obecność kwasu chlorogenowego, kwasu kawowego, kwercetyny, rutozydu i werbaskozydu;
- Wyniki analiz fitochemicznych roślin otrzymanych z nasion. Oprócz obecności kwasu chlorogenowego, kwasu kawowego, kwercetyny, rutozydu i werbaskozydu udowodniono obecność kwasu p-hydroksybenzoesowego, kwasu p-kumarowego, kwasu ferulowego oraz (+)-katechiny;
- Wyniki porównawczych analiz ekstraktów z części nadziemnych i podziemnych (korzenie) roślin otrzymanych „*in vitro*” i z nasion. W ekstraktach z części nadziemnych główną grupę związków stanowiły flawonoidy, w ekstraktach z korzeni – kwasy fenolowe (odpowiednio ok. 280 i 970 mg% i ok. 760 i 1200 mg%). Werbaskozyd był w większych ilościach obecny w ekstraktach z korzeni (ok. 26 i ok. 37 mg%) niż w ekstraktach z części nadziemnych (ok. 18 i ok. 19 mg%). Udowodniono ok. 3,5-krotnie większą zawartość kwercetyny oraz ok. 1,5-większą zawartość kwasów fenolowych w ekstraktach z roślin zregenerowanych *in vitro*, w porównaniu z ekstraktami z roślin wyrosłych z nasion;
- Wyniki badań wpływu wodno-metanolowych ekstraktów roślinnych na przeżywalność linii komórek CHO (jajnika chomika chińskiego). Wyznaczono wartości IC<sub>50</sub>, równe odpowiednio 1,7 mg/ml i 2,8 mg/ml, dla ekstraktów z korzeni i części nadziemnych roślin zregenerowanych *in vitro*. Przeżywalność komórek CHO po zastosowaniu ekstraktów z roślin otrzymanych z nasion była podobna. Badania te pozwoliły na ustalenie optymalnych stężeń ekstraktów do dalszych badań (0,05; 0,1 i 0,5 mg/ml);
- Wyniki badań efektu ochronnego i naprawczego na DNA wodno-metanolowych ekstraktów w komórkach CHO, traktowanych H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Komórki traktowane H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ekstraktami roślinnymi wykazywały efekt naprawczy na DNA, proporcjonalny do rosnących stężeń ekstraktów. Ekstrakty z części nadziemnych i korzeni roślin zregenerowanych *in vitro* miały znacznie silniejszy efekt ochronny na DNA niż odpowiednie ekstrakty z roślin otrzymanych z nasion. Najbardziej skuteczny był ekstrakt z korzeni roślin otrzymanych *in vitro*. Po 2 godz. komórki CHO traktowane H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ekstraktem wykazały całkowitą naprawę DNA;

- Wyniki badań nad zmianą ekspresji genów antyoksydacyjnych (SOD2, CAT i GPx) w komórkach CHO pod wpływem wodno-metanolowych ekstraktów. Udowodniono, że wszystkie badane ekstrakty powodują zmianę ekspresji genów po 24-godz. inkubacji (wzrost ok. 2,5-krotny), co świadczy o ich antyoksydacyjnym potencjale;
- Założenie i prowadzenie z powodzeniem kultur korzeni transformowanych i nietransformowanych *L. sibiricus*. W wyniku transformacji genetycznej z użyciem szczepu A4 *Agrobacterium rhizogenes* uzyskano 4 klony korzeni. Klon charakteryzujący się najszybszym wzrostem i zawierający najwięcej korzeni bocznych wytypowano do dalszych badań. Kultury korzeni nietransformowanych otrzymano przez odcięcie korzeni z 5-tygodniowych roślin zregenerowanych *in vitro*. Kultury prowadzono na podłożu Schenka-Hildebrandta (SH) z dodatkiem IBA (kwasu  $\beta$ -indolilomastowego). Oba typy kultur prowadzono przez okres ok. 1 roku (10 pasaży po 5 tygodni);
- Wyniki ilościowych oznaczeń związków fenolowych w ekstraktach z korzeni transformowanych i nietransformowanych. Potwierdzono obecność 6 kwasów fenolowych, 3 flawonoidów i werbaskozydu. Dominującymi ilościowo metabolitami były kwasy fenolowe (odpowiednio 1744 i 814 mg%). Głównymi związkami były kwas chlorogenowy, kwas kawowy i kwas elagowy. Zawartości kwasu chlorogenowego, kwasu kawowego oraz werbaskozydu były wyższe w kulturach korzeni transformowanych, odpowiednio ok. 2,5-, 3- i 1,28-krotnie wyższe, niż w kulturach korzeni nietransformowanych;
- Wyniki biologicznych badań – cytotoksyczności i indukcji apoptozy w komórkach glejaka ludzkiego (IV stopień zaawansowania) przez wodno-metanolowe ekstrakty z korzeni transformowanych i nietransformowanych *L. sibiricus*. Wykazano efekt cytotoksyczny obu ekstraktów silniejszy dla ekstraktów z korzeni transformowanych. Pod wpływem obu ekstraktów wzrastała liczba komórek apoptotycznych (odpowiednio do 33% i 14%). Podjęte próby wyjaśnienia mechanizmu indukcji apoptozy wskazują na zmiany ekspresji genów Bax, Bel-2 i TP53;
- Wyniki analiz olejków eterycznych produkowanych w kulturach korzeni nietransformowanych i transformowanych. Olejki uzyskano z wydajnością 0,06% i 0,04%. W olejku z korzeni nietransformowanych zidentyfikowano 70 składników (główne związki, to:  $\beta$ -selinen (9,9%), selina-4,7-dien (9,7%),  $\beta$ -kariofyllen (7,3%); w olejku z korzeni transformowanych zidentyfikowano 67 związków (główne związki, to:  $\beta$ -kariofyllen (22,6%) i germakren D (19,8%);
- Wyniki badań cytotoksyczności olejków z korzeni nietransformowanych i transformowanych prowadzonych na komórkach glejaka (IV stadium) i na prawidłowych astrocytach ludzkich. Udowodniono, że olejki wykazują 4-krotnie silniejsze działanie na komórki glejaka niż na prawidłowe astrocyty;
- Wyniki badań aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej olejków z korzeni nietransformowanych i transformowanych. Wykazano, że oba olejki wykazują aktywność przeciwko *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* oraz *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida albicans*;
- Wyniki badań aktywności antyoksydacyjnej olejków z korzeni nietransformowanych i transformowanych. W testach DPPH i ABTS oba olejki wykazały niską aktywność antyoksydacyjną;

- Wyniki badań wpływu olejków na poziom cytokin zapalnych i prozapalnych. Oba olejki obniżały poziom cytokin stymulowany lipopolisacharydem (LPS) – IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ ; nie wpływały na poziom IL-2 i IL-4;
- Wyniki badań nad wpływem olejków na zmianę ekspresji genów cytokin. Wykazano obniżenie poziomu ekspresji genów cytokin - IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  w komórkach stymulowanych przez LPS oraz brak zmian w poziomie ekspresji genów IL-2 i IL-4;
- Uzyskanie kultur korzeni transformowanych z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1. Do transformacji użyto 5-tygodniowe wyhodowane *in vitro* pędy *L. sibiricus*. Transformację przeprowadzono z wykorzystaniem *A. rhizogenes* (szczep A4). Otrzymano 4 klony korzeni transformowanych z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 i 1 klon bez tej informacji genetycznej. We wszystkich transgenicznym klonach udowodniono nadekspresję genu dla AtPAP1;
- Wyniki zawartości kwasów fenolowych w uzyskanych kulturach korzeni z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego i bez tej cechy. Wykazano większą zawartość 4 kwasów fenolowych (kwas kawowy, kwas ferulowy, kwas p-kumarowy i kwas chlorogenowy) w klonach z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego w porównaniu do klonu bez tej informacji genetycznej. Wytypowano klon I, jako najbardziej produktywny. Produkował on 4,72-krotnie i 2,72-krotnie większe ilości odpowiednio, kwasu chlorogenowego i kwasu kawowego, niż klon bez nadekspresji czynnika transkrypcyjnego (1939 mg% i 1138 mg%);
- Wyniki wpływu wodno-metanolowego ekstraktu z korzeni klonu I na przeżywalność komórek glejaka (IV stadium) i prawidłowych ludzkich astrocytów. Udowodniono działanie cytotoksyczne na komórki glejaka przy IC<sub>50</sub>=0,75 mg/ml (stężenie niższe niż dla korzeni transformowanych bez nadekspresji czynnika transkrypcyjnego (IC<sub>50</sub>=2,4 mg/ml). Badany ekstrakt nie wykazywał działania cytotoksycznego na prawidłowe komórki astrocytów ludzkich;
- Wyniki badań aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej ekstraktów wodno-metanolowych z korzeni klonu I. Wykazano aktywność przeciwko *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *E. coli* oraz przeciwko *S. cerevisiae* i *C. albicans*;
- Wyniki badań uszkodzeń DNA w komórkach glejaka pod wpływem wodno-metanolowego ekstraktu korzeni klonu I. Wykazano, że ekstrakt z korzeni klonu I indukuje większą ilość uszkodzeń w komórkach glejaka (IV stadium) oraz w linii komercyjnej glejaka U87MG;
- Wyniki badań poziomu (pPARP1) – markera apoptozy i ufosforylowanego histonu  $\gamma$ H2A.X w komórkach glejaka pod wpływem ekstraktu z korzeni klonu I. Udowodniono, że ekstrakt powodował wzrost liczby komórek apoptotycznych w porównaniu z ekstraktem z korzeni bez nadekspresji czynnika transkrypcyjnego. Oba ekstrakty zwiększały poziom histonu (oznaczenia testem ELISA); ekstrakt z korzeni klonu I, w większym stopniu;
- Wyniki badań nad zmianą poziomu ekspresji genów DNMT1 i UHRF1 związanych z apoptozą. Wykazano obniżenie poziomu ekspresji genów w komórkach glejaka (IV stadium) i glejaka komercyjnego; większe w przypadku ekstraktu z korzeni klonu I;
- Wyniki biotechnologicznych badań kultur korzeni klonu I prowadzonych jako kultury wytrąsane w różnych objętościach podłoży hodowlanych (kolby Erlenmeyera o obj. 300 ml, 1 l, 3 l, 5 l) oraz w rozpyłowym bioreaktorze (obj. 5 l). Najwyższy przyrost świeżej biomasy uzyskano w bioreaktorze (50-krotny przyrost w ciągu 30 dni, 312 g/l). Najwyższy przyrost



suchej biomasy uzyskano również w bioreaktorze (20,83 g/l) oraz w 1 l kolbach (13,2 g/l). Były to przyrosty 34- i 22-krotne w ciągu 30 dni;

- Wyniki fitochemicznych badań kwasów fenolowych w kulturach korzeni klonu I hodowanych w kolbach Erlenmeyera i bioreaktorze rozpyłowym. W badanej biomacie stwierdzono obecność 5 kwasów fenolowych – kwasu neochlorogenowego, kwasu chlorogenowego, kwasu kawowego, kwasu p-kumarowego i kwasu ferulowego. Dominowały ilościowo 2 związki – kwas chlorogenowy i kwas kawowy. Maksymalną zawartość kwasu chlorogenowego potwierdzono w kulturach bioreaktorowych (2150 mg%) i prowadzonych w 1-litrowych kolbach (2300 mg%). Kultury bioreaktorowe produkowały więcej kwasu kawowego (1450 mg%) niż te rosnące w kolbach (920-1210 mg%), osiągały też lepsze przyrosty biomasy;

- Wyniki badań dotyczących poziomu ekspresji genów (PAL, C4H i 4CL) uczestniczących w szlaku fenylopropanoidowym w korzeniach klonu I. Badania wykazały wzrost poziomu ekspresji badanych genów w korzeniach klonu I w porównaniu z korzeniami bez nadekspresji czynnika transkrypcyjnego. Zwiększona produkcja kwasów fenolowych w korzeniach klonu I może wynikać z „manipulacji” w szlaku fenylopropanoidowym;

- Wyniki biologicznych badań nad wpływem wodno-metanolowych ekstraktów z korzeni klonu I na wzrost komórek czerniaka (A-2051). Udowodniono hamowanie wzrostu komórek (w testowanym zakresie stężeń 2,5-40 µg/ml). Lepsze działanie wykazano dla ekstraktów z korzeni klonu I (przy stężeniu = 40 µg/ml), niż dla ekstraktów z korzeni bez nadekspresji czynnika transkrypcyjnego;

- Wyniki badań właściwości antyoksydacyjnych ludzkiego osocza po traktowaniu wodno-metanolowymi ekstraktami z korzeni klonu I. Testy ABTS, DPPH oraz FRAP wykazały zwiększony potencjał antyoksydacyjny osocza. Większy efekt uzyskano pod wpływem ekstraktów z korzeni klonu I, niż ekstraktu z korzeni bez nadekspresji czynnika transkrypcyjnego;

- Wyniki badań cytotoksyczności ekstraktów z korzeni klonu I na liniach komórkowych CCRF-CEM (ostra białaczka limfoblastyczna), K-562 (przewlekła białaczka szpikowa) i A549 (niedrobnokomórkowy rak płuc). Wykazano cytotoksyczność w stosunku do komórek CCRF-CEM i K-562 oraz brak takiego efektu w stosunku do linii A549. Ekstrakty z korzeni klonu I wykazywały wyższą cytotoksyczność w porównaniu z ekstraktami z korzeni bez nadekspresji czynnika transkrypcyjnego;

- Wyniki badań wpływu wyciągów z korzeni klonu I na zmianę potencjału mitochondrialnego w liniach komórkowych CCRF-CEM, K-562 i A549. Wykazano obniżenie potencjału mitochondrialnego we wszystkich liniach komórkowych (największy efekt dla linii CCRF-CEM i K-562). Lepsze działanie wykazywał ekstrakt z korzeni klonu I, niż ekstrakt z korzeni bez nadekspresji czynnika transkrypcyjnego;

- Wyniki badań wpływu wyciągów z korzeni klonu I na uszkodzenia mitochondrialnego DNA (mtDNA) i jądrowego (nDNA) oraz zmian liczby kopii mitochondrialnych. Nie wykazano zmiany liczby kopii mtDNA dla żadnej z testowanych linii komórkowych (K-562, CRF-CEM i A549) pod wpływem ekstraktów z korzeni. Jedynie niewielki wzrost zaobserwowano w liniach K-562 i CCRF-CEM. W badaniach uszkodzeń DNA (mtDNA i nDNA) zastosowano metodę SLR-qRT-PCR. W przypadku linii komórkowych CCRF-CEM i K-562 stwierdzono znaczny wzrost uszkodzeń mtDNA (w regionie ND1). Badania nie wykazały znaczących różnic

pomiędzy wpływem testowanych ekstraktów z korzeni, a liczbą uszkodzeń mtDNA. W badaniach nDNA wykazano wzrost uszkodzeń dla komórek K-562 i CCRF-CEM (w regionie TP53) pod wpływem obu testowanych ekstraktów.

Autor rozprawy habilitacyjnej po raz pierwszy udowodnił, że założone przez Niego różne typy kultur *in vitro* *Leonurus sibiricus* oraz zregenerowane *in vitro* rośliny, a także rośliny wyrosłe z nasion produkują związki fenolowe, w tym głównie wybrane kwasy fenolowe – m.in. kwas chlorogenowy i kwas kawowy. Najbogatszym źródłem tych związków okazały się kultury korzeni transformowanych oraz kultury korzeni transformowanych z nadekspresją czynnika transkrypcyjnego AtPAP1 rosnące w bioreaktorze rozpyłowym.

Praca habilitacyjna Kandydata promuje potencjalne możliwości wykorzystania rozwiązań biotechnologicznych w zabezpieczeniu przemysłu farmaceutycznego w cenne surowce pochodzenia pozaeuropejskiego. Praca ta promuje równocześnie potrzebę sięgania do wskazań etnobotanicznych i etnofarmakologicznych, w celu poszerzenia oferty fitoterapeutycznej w Europie.

Wymienione wartościowe wyniki badań stanowiące rozprawę habilitacyjną są oryginalnym osiągnięciem naukowym dr Przemysława Sitarka, wnoszącym istotny wkład w rozwój biotechnologii roślin leczniczych.

Całość materiałów „postępowania awansowego” przedstawionego do oceny dowodzi, że dr Przemysław Sitarek jest wysokiej klasy specjalistą w badaniach z zakresu biotechnologii roślin leczniczych i biologii medycznej.

Bardzo wysoko oceniam całość dorobku naukowego dr Przemysława Sitarka, zarówno prace stanowiące osiągnięcie naukowe, jak i pozostałą aktywność naukową oraz biegłość w interdyscyplinarnych pracach eksperymentalnych.

Wysoki poziom merytoryczny prac oryginalnych Habilitanta, ich interdyscyplinarny charakter udowadniają, że bardzo dobre prace mogą powstawać w wyniku współpracy zarówno krajowych, jak i zagranicznych specjalistycznych placówek naukowych o różnych uzupełniających się profilach naukowo-badawczych.

#### **IV. Ocena działalności dydaktycznej i popularyzatorskiej**

Habilitant posiada już pewne doświadczenie dydaktyczne. Zdobył je prowadząc różne formy zajęć dydaktycznych, zarówno ćwiczenia, jak i seminaria dla studentów macierzystego Wydziału, studiujących na trzech kierunkach – farmacja, analityka medyczna i kosmetologia. Dla studentów I roku kierunku farmacja prowadzi ćwiczenia z dwóch przedmiotów „Biologia z genetyką” i „Botanika farmaceutyczna” oraz zajęcia terenowe z systematyki roślin.

Dla studentów I roku kierunku analityka medyczna prowadzi ćwiczenia z przedmiotu „Biologia z genetyką”, z kolei dla studentów II roku ćwiczenia z przedmiotu „Diagnostyka parazytologiczna”. Dla tego kierunku studiów przygotował ponadto wykłady z przedmiotu „Biologia z genetyką”.

Z kolei dla studentów I roku kierunku kosmetologia prowadzi seminaria z przedmiotu „Biologia z genetyką”.

Do chwili obecnej Habilitant był promotorem 1 pracy magisterskiej na kierunku farmacja, 2 prac magisterskich i 1 pracy licencjackiej na kierunku kosmetologia oraz pełnił funkcję opiekuna naukowego 1 pracy magisterskiej na kierunku farmacja.

Habilitant dbał o podnoszenie swoich kompetencji dydaktycznych. Był uczestnikiem „Kursu Metodyki Nauczania w Dyscyplinach Biomedycznych” (2016/17) oraz Kursu doszkalającego dla kadry nauczycielskiej „Ready to Teach” (2018).

Habilitant jest nauczycielem akademickim wysoko ocenianym przez studentów za jakość pracy dydaktycznej. Habilitantowi można pogratulować Nagrody Dydaktycznej dla najlepszego nauczyciela akademickiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w roku akademickim 2015/16.

Habilitant uczestniczył też w popularyzowaniu nauki. Dotychczas był współautorem licznych (30!) prezentacji posterowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

## **V. Podsumowanie**

Całość materiałów „postępowania awansowego”, przedstawiona do oceny świadczy o wielokierunkowej wiedzy i umiejętnościach Habilitanta do prowadzenia samodzielnych badań naukowych. Wysoko oceniam aktywność i dorobek naukowy dr Przemysława Sitarka, szczególnie wysoko prace stanowiące podstawę habilitacji, w których Habilitant bazował zarówno na swojej bogatej wiedzy ogólnobioologicznej oraz z zakresu biologii medycznej, biologii molekularnej, genetyki, biotechnologii roślin i fitochemii w połączeniu z biochemią kliniczną, chemią kliniczną, chemią analityczną i z farmakologią.

Wyniki pracy habilitacyjnej dr Przemysława Sitarka stanowią istotny, znaczny wkład w rozwój nauk farmaceutycznych, w tym szczególnie biotechnologii roślin leczniczych, i są w pełnym tego słowa znaczeniu osiągnięciem naukowym.

Pracę habilitacyjną dr Przemysława Sitarka uważam za bardzo wartościową, przede wszystkim ze względu na nowatorstwo prawie wszystkich wyników badań i ich potencjalną aplikacyjność.

Posiadając znaczny dorobek naukowy, talent badawczy i znaczące już mimo krótkiego 7-letniego stażu pracy zawodowej doświadczenie badawcze, a także doświadczenie w pracy dydaktycznej, Pan dr Przemysław Sitarek jest bardzo dobrym Kandydatem do uzyskania stopnia naukowego doktora habilitowanego.

**Stwierdzam, że prace stanowiące podstawę habilitacji i pozostałe osiągnięcia naukowe są oryginalnym, istotnym dorobkiem naukowym dr Przemysława Sitarka. Spełniają zatem wymagania obowiązującej Ustawy w sprawie ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.**

**W związku z powyższym, mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, wniosek o dopuszczenie dr n. med. Przemysława Sitarka do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.**

Kraków, 26.03.2019 r.

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej UJ CM



*prof. dr hab. Halina Ekiert*