

dr hab. Katarzyna Sobierajska, prof. UMed
Zakład Molekularnych Mechanizmów Komórkowych
Katedra Nauk Biomedycznych
Wydział Nauk o Zdrowiu
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, 12.02.2024 r.

RECENZJA

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Rakowskiego zatytułowanej „Ocena właściwości antyoksydacyjnych ergotioneiny i jej potencjalnej roli jako czynnika przeciwdziałającego neurodegeneracji” przedstawionej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w celu uzyskania stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauki biologiczne”.

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska mgr. Michała Rakowskiego została wykonana w Katedrze Biologii Nowotworów i Epigenetyki Instytutu Biofizyki Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem Pani Promotor dr hab. Agnieszki Grzelak.

Przedstawiona mi do oceny dysertacja została zredagowana jako monografia, w której Doktorant analizuje właściwości ergotioneiny i jej roli jako czynnika przeciwdziałającego neurodegeneracji. Struktura pracy obejmuje: spis treści (1 strona), wykaz skrótów (4 strony), wstęp (11 stron), cel pracy (1 strona), opis materiału i metody (16 stron), prezentację wyników (41 stron), dyskusję (36 stron), podsumowanie (2 strony), streszczenia w języku polskim i angielskim (po 2 stron) oraz bibliografię (16 stron) liczącą 232 pozycje. Całość pracy zajmuje 123 strony i charakteryzuje się układem typowym dla prac doktorskich z tego zakresu.

Opis i ocena merytoryczna rozprawy

We Wstępie recenzowanej rozprawy doktorskiej Doktorant wprowadza czytelnika w tematykę pracy, skupiając się na opisie ergotioneiny (EGT). Część ta została napisana w sposób przejrzysty i jasny. Po początkowo ogólnej charakterystyce EGT Doktorant przechodzi do opisu właściwości chemicznych cząsteczki, źródeł jej pochodzenia oraz obiegu i akumulacji w obiegu troficznym. Następnie opisuje drogi biosyntezy związku i sposób jego transportu skupiając się na opisie transportera kationów organicznych typu pierwszego (SLC22A4) odpowiedzialnego za wnikanie EGT do komórek. Bardzo interesujące są tutaj fragmenty wskazujące powiązania pomiędzy modulacją aktywności SLC22A4 a rozwojem stanów patologicznych wskazującym na możliwość dalszych analiz receptora jako potencjalnego celu terapeutycznego.

W kolejnym podrozdziale Doktorant opisuje drogę transportu i lokalizacji EGT w organizmie człowieka pokazując wpływ licznych czynników regulujących stężenie związku w surowicy (dieta, wiek, choroby związane ze stanem zapalnym), a także jego metabolizm, by zakończyć rozdział rozważaniem funkcji EGT jako antyoksydantu i chelatora.

Należy zauważyć, że Wstęp pracy napisany jest w większości jasno i przejrzysto, a sposób przedstawienia treści jest przystępny i zrozumiały. Jednakże, biorąc pod uwagę tytuł dysertacji, zabrakło w nim informacji dotyczących procesu neurodegeneracji i istotności poszukiwania związków mających potencjał zapobiegania lub przeciwdziałania temu niepożądanemu procesowi. Nie znajduję więc we Wstępie przesłanki do Celów, jakie Doktorant postawił sobie w przedłożonej pracy. Tym bardziej że zakończenie rozdziału Wstęp nie prowadzi do ich wyznaczenia. Krótka informacja już w rozdziale Cel pracy, informująca o wcześniejszych analizach EGT jako neuroprotektora, bez podania odnośników literaturowych i choćby skromnego opisu ich wyników jest w mojej ocenie niewystarczająca.

W rozdziale Cele doktorant przedstawia trzy główne z nich. Także tutaj ze względu na wcześniejszy brak informacji we Wstępie zabrakło mi jasnego i logicznego przedstawienia przyczyny ich wyboru. Stwierdzenie, że dotychczasowe badania neuroprotektynowego działania EGT oparte było o modele zwierzęce oraz pochodzące od zwierząt linie komórkowe o niestabilnym karyotypie jest zbyt lakoniczne i nie wskazuje, dlaczego dla doprecyzowania mechanizmu działania EGT w ludzkich komórkach nowotworowych Doktorant wybrał przedstawione Cele pracy (szczególnie w odniesieniu do punktu 2 i 3).

W rozdziale IV Materiał i metody Doktorant bardzo szczegółowo opisał materiał, jak i stosowane w pracy techniki badawcze pozwalające nie tylko zrozumieć poszczególne etapy prowadzenia badań, ale także odtworzyć procedury badawcze w innych laboratoriach prowadzących podobne badania. Zgodnie z zamieszczoną już w celach pracy informacją Doktorant wybrał do swoich badań dwie linie komórkowych SH-SY5Y (linia komórkowa wyprowadzona z ludzkiego nerwiaka zarodkowego) oraz HepG2 (komórkowi nowotworu wątrobowo-komórkowego). Także tutaj jednak nie znajdują przyczyny wyboru drugiej z linii komórkowych.

Należy natomiast nie tylko podkreślić prawidłowość doboru metod badawczych w stosunku do założonych celów pracy, ale przede wszystkim ich liczebność i różnorodność świadcząca o bardzo wysokich zdolnościach laboratoryjnych Doktoranta. Jedynym uchybieniem w tej części pracy jest brak informacji o przyczynie wyboru grupy białek do badań metodą Western blot. Zostałam więc ponownie zmuszona niejako do domyslenia się, które ścieżki molekularne są w obszarze zainteresowań Doktoranta. Sądzę, że zamieszczenie we wstępie podrozdziału pozwalający czytelnikowi na zrozumienie tego wyboru były wskazane.

W rozdziale Wyniki Doktorant przedstawia dokumentację uzyskanych rezultatów w sposób bardzo szczegółowy, rozpoczynając od pomiaru całkowitej wydajności antyoksydacyjnej EGT *in vitro*, a następnie oceny właściwości antyoksydacyjnych EGT w układzie komórkowym. Efekt cytotoksyczności powinien być przeanalizowany w oparciu o wyznaczone wartości IC50 z krzywych

przeżywalności pokazanych na rycinie 5 (analogicznie też rycina 24). Dodatkowo przedstawienie wyników z wycięciem fragmentu wykresu nie znalazło mojego uznania. Sądzę, że przebiegi krzywych pozwalają na takie dobranie wymiarów wykresów, by przestawić je w całości. Jest to jednakże jedynie drobna uwaga redaktorska. Co bardziej zaskakujące na stronie 49. Doktorant przedstawia wyniki przeżywalności komórek linii SH-SY5Y preinkubowanych z EGT i traktowanych chlorkiem litu w zupełnie odmiennej formie. W postaci tabeli przedstawiającej wartości IC50 z 95% przedziałem ufności. W mojej opinii wszystkie wyniki oparte o jeden rodzaj testu powinny być przedstawione w sposób zunifikowany, co po pierwsze pozwala porównać dane, a po drugie ułatwia zrozumienie treści.

W kolejnej części prezentacji Wyników Doktorant przedstawia ocenę potencjału RGT do modulacji sygnalizacji zależnej od kinazy GSK3. Jednym z etapów jest tutaj dodanie chlorku litu. Niestety ponownie Doktorant nie przedstawił powodu swojego działania. Co prawda w oparciu o własną wiedzę rozumiem sens tego zabiegu, jednak z obowiązku recenzenckiego muszę przypomnieć o konieczności a wręcz o obowiązku Doktoranta przedstawienia mniej wprawnemu czytelnikowi przyczyny i skutku każdego kroku poszczególnych procedur doświadczalnych.

Na stronie 56 pracy znajdujemy informację „W celu analizy potencjału EGT do modulowania szlaku EMT zbadani poziom następujących białek: wimentyny, N-kadheryny, Klaudyny-1, β -kateniny, ZO1, Snail, Slug, ZEB1 i E-kadheryny (Ryc22)”. Tu ponownie moje doświadczenie i wiedza w zakresie badania przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej, stanowiącej jeden z głównych obszarów mojej pracy badawczej pozwala mi na zrozumienie przyczyny podjęcia przez Doktoranta tego rodzaju analiz. Jednak w mojej ocenie brakuje w dotychczas przedstawionym tekście pracy jakiegokolwiek informacji o samym procesie i nawiązania, dlaczego badania te zostały podjęte.

Niestety sposób przedstawia wyników analiz poziomu białka w całej pracy posiada mankamenty. Chciałabym poprosić Doktoranta o wyjaśnienie przyczyny normalizacji wyniku do próby kontrolnej i dodatkowo bez podania odchyień

wyników, a także przyczyny zastosowania testu t-Studenta, także w przypadku gdy porównywane jest kilka grup.

Także w tej części badań brakuje unifikacji przedstawienia wykresów. Na rycinie 22 i 23 brakuje na osi OY informacji o tym, które z białek jest analizowane. Doktorant nie pozostawia nas co prawda bez tej wiedzy zamieszczając ją w opisie pod rysunkiem, jednak przyznam, że zabieg ten nie jest zbyt wygodny. Nieznaczne zmniejszenie wielkości wykresów z pewnością pozwoli na dołączenie stosownego opisu osi OY. We wszystkich przypadkach Doktorant nie podał informacji czy odchylenia podane są jako SD, czy SEM. Uwaga ta odnosi się także do większości innych wyników, tylko w nielicznych została zamieszczona informacja, o tym, że wynik przedstawiono jako średnią arytmetyczną wyników cząstkowych \pm SD (np. Rycina 27). Dodatkowo na Rycinie 40 znalazłam kolejność nieściśłość, a mianowicie białka ABCC1 i ABCC2 na rycinie zostały opisane jako MRP1 i MRP2. Stosowanie w ten sposób nazw „alternatywnych” wprowadza zamieszanie, szczególnie że w znakomitej większości pracy Doktorant opisując te białka stosuje jedynie nazwy ABCC1 lub ABCC2. Sugeruję więc ujednoczenie w tym zakresie także Ryciny 40.

Bardzo ciekawe wyniki przedstawione w pracy dotyczą analizy zdolności EGT do modulacji aktywności transporterów ABC za pomocą testów funkcjonalnych. Niestety są to jedynie wyniki reprezentacyjne. Sugeruję więc, jeżeli istnieje zamiar opublikowania wyników, dopracowania tej części analiz tak by mogły one stanowić mocny dowód badawczy, a nie jedynie przesłankę.

W ostatniej części swojej pracy Doktorant przedstawia wielostronicową dyskusję. Należy podkreślić, że wyniki przedyskutowane są bardzo starannie i szeroko w stosunku do istniejącej w temacie literatury. W mojej opinii jest trochę zbyt mało prac najnowszych, ale być może mniej odpowiadały one interpretacji uzyskanych wyników. Natomiast co istotniejsze wiele wiadomości zawartych w tej części pracy powinno znaleźć się w jej wstępie. Pozwoliło by to z pewnością na lepsze zrozumienie zarówno wyznaczonych celów pracy (szczególnie ostatniego), a także nadało by większej przejrzystości i łatwości w analizie poszczególnych wyników. Niestety przy tym obecnym układzie pracy dopiero w trakcie czytania

Dyskusji mogłam znaleźć odpowiedzi na pytania, czy niejasności, które przytoczyłam powyżej, a które dopiero w tej części pracy mogłam zweryfikować.

Kończąc analizę przedstawionej pracy chciałabym podkreślić, że jej założenia, cele i sposób zaprojektowania i prowadzenia badań są spójne i prawidłowe. Drobne nieścisłości w prezentacji danych czy też ich analizie po naniesieniu niezbędnych zmian i unifikacji nie obniżają wysokiej oceny pracy a są wymienione ze względu na obowiązek recenzencki, a także w celu ułatwienia publikacji wyników.

Wniosek końcowy

Podsumowując, w mojej ocenie rozprawa doktorska Michała Rakowskiego zatytułowana „*Ocena właściwości antyoksydacyjnych ergotioneiny i jej potencjalnej roli jako czynnika przeciwdziałającego neurodegeneracji*” w pełni odpowiada wymogom Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668) stawianym pracom doktorskim. W związku z tym zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Michała Rakowskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Sobierajska