



dr hab. Lucyna Mrówczyńska, prof. UAM
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii
Zakład Biologii Komórki

Poznań, dn. 28.02.2024 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Michała Macieja Rakowskiego
pt. „Ocena właściwości antyoksydacyjnych ergotioneiny
i jej potencjalnej roli jako czynnika przeciwdziałającego neurodegeneracji”**

Aspekt formalny

Recenzja została sporządzona w związku z decyzją Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne, podjętą na posiedzeniu w dniu 19.12.2023 roku (zgodnie z art. 190 ust. 3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku *Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce*, Dz.U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.).

Układ pracy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska obejmuje łącznie 123 strony numerowane. Treści pracy są podzielone na rozdziały główne (wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie) i rozdziały zawierające wykaz stosowanych skrótów, streszczenia pracy sporządzone w języku polskim i angielskim oraz spis publikacji.

Rozdział *Wstęp* (strony od 7 do 17), prezentuje aktualny stan wiedzy na temat właściwości prozdrowotnych ergotioneiny (EGT). Treści tego rozdziału oparto na 83 publikacjach spośród 232 cytowanych w rozprawie. *Wstęp* Doktorant podzielił na 5 podrozdziałów nienumerowanych, w których kolejno przedstawia dane na temat aktywności biologicznej i właściwości EGT. Analiza aktualnego stanu wiedzy na temat roli EGT jako antyoksydanta o właściwościach cytoprotekcyjnych, umożliwiła Autorowi zdefiniowanie celu pracy oraz postawienie hipotezy badawczej, które zawarł w rozdziale *Cel pracy* (strona 18). W rozdziale *Materiały i metody* (strony od 19 do 34), w którym wyróżniono 15 podrozdziałów nienumerowanych, Doktorant zaprezentował opis wykorzystanych materiałów i zastosowanych metod badawczych. Wyniki badań zamieszczono na stronach od 35 do 75 w

4 podrozdziałach nienumerowanych i wsparto 38 rycinami oraz 1 tabelą. W rozdziale, *Dyskusja* (strony 76 do 102), Doktorant zawarł omówienie uzyskanych rezultatów na tle literatury (130 pozycji z 232 cytowanych w rozprawie). W rozdziale *Podsumowanie* (strony od 102 do 103), Doktorant przedstawił najważniejsze wyniki swoich badań oraz wnioski wypływające z analizy otrzymanych danych. Rozprawę doktorską zamykają streszczenia pracy przygotowane w języku polskim (str. 104-105) oraz angielskim (str. 106) i spis literatury (str. 107-123), obejmujący 232 pozycje. Zastosowany przez Doktoranta układ rozprawy doktorskiej jest zgodny z ogólnie przyjętym w pracach eksperymentalnych i nie budzi zastrzeżeń.

Merytoryczna ocena rozprawy

W związku ze wydłużaniem się życia człowieka i w efekcie postępującym procesem starzenia społeczeństw, obserwuje się wzrost zachorowań na choroby cywilizacyjne, w tym choroby neurodegeneracyjne. Wiele starszych osób doświadcza trudności związanych z zaburzeniami funkcji poznawczych, zespołami otępiennymi, a także chorobą Alzheimera lub Parkinsona. Pomimo znaczących postępów w naukach biomedycznych, zaburzenia strukturalno-funkcjonalne układu nerwowego są nadal trudne do leczenia, a prognozy nie są niekorzystne. W organizmach starzejących się poziom stresu oksydacyjnego wzrasta, co sprawia, że neurony są narażone na uszkodzenia wywołane reaktywnymi formami tlenu. Wyniki licznych badań potwierdzają neuroprotektoryjne działanie różnorodnych substancji pochodzenia naturalnego o właściwościach antyoksydacyjnych. Związki o właściwościach przeciwutleniających mogą odegrać istotną rolę w diecie ukierunkowanej na zapobieganie chorobom neurodegeneracyjnym. W tej perspektywie, prowadzenie badań mających na celu wykazanie antyoksydacyjnego i neuroprotektoryjnego działania naturalnych związków biozgodnych i zdefiniowanie mechanizmu ich działania jest ważne, zarówno ze względów poznawczych, jak i aplikacyjnych.

Problematyka rozprawy doktorskiej mgra Michała Rakowskiego, dotycząca aktywności antyoksydacyjnej i właściwości neuroprotektoryjnych ergotioneiny (EGT) oraz mechanizmu jej cytoochronnego działania, wpisuje się w ten aktualny nurt badań. Wielopoziomowe badania nad prozdrowotnym działaniem EGT obecnej w znaczących ilościach m.in. w grzybach, doczekały się wprawdzie licznych opracowań w literaturze tematu, jednakże molekularny mechanizm jej neuroprotektoryjnego działania w warunkach stresu oksydacyjnego, nie jest dobrze poznany. Podjęcie przez Doktoranta trudu przeprowadzenia badań w celu wyjaśnienia antyoksydacyjnego i neuroprotektoryjnego mechanizmu działania EGT, uważam zatem za uzasadnione, zwłaszcza z uwagi na fakt, że syntetyczna L-EGT została uznana za bezpieczny dodatek do żywności i może znaleźć szerokie zastosowanie.

W tematykę swoich badań Doktorant wprowadza zwięzłym *Wstępem*, który jest najkrótszym (11 stron) rozdziałem rozprawy doktorskiej. *Wstęp* został podzielony na 5 podrozdziałów, w których kolejno przedstawiono właściwości EGT, ze szczególnym uwzględnieniem jej aktywności antyoksydacyjnej, biosyntezy w komórkach oraz transportu do komórek przy udziale transportera kationów organicznych typu pierwszego SLC22A4 i jej metabolizmu. Autor zwraca uwagę na udokumentowaną już rolę EGT w ochronie komponentów komórkowych przed uszkodzeniami wywołanymi nadprodukcją wolnych rodników, w tym najbardziej reaktywnego rodnika hydroksylowego oraz zdolność EGT do redukcji w reakcji katalizowanej przez GSH/GSSG, co warunkuje jej dostępność w komórce. W poszczególnych rozdziałach Autor uwzględnił najważniejsze publikacje (83 spośród 232 cytowanych w rozprawie), dotyczące aktywności biologicznej i właściwości prozdrowotnych EGT. Niemniej jednak, treści *Wstępu* nie są w całości przyporządkowane stawianym przez Autora celom badań oraz hipotezie badawczej i powinny zostać rozszerzone w kontekście przeprowadzonych eksperymentów oraz analiz. Mianowicie, we *Wstępie* nie uwzględniono treści dotyczących wyboru modelu badawczego, tj. komórek nowotworowych SH-SY5Y (nerwiak zarodkowy) oraz HepG2 (rak wątrobowokomórkowy). Oczywistym jest, że neuronalne linie komórkowe SH-SY5Y są najczęściej stosowanym modelem w badaniach nad chorobami Alzheimera, Parkinsona oraz Huntingtona, jednak wybór komórek raka wątrobowokomórkowego linii HepG2, powinien być umocowany literaturze i uzasadniony przez Autora. Odczuwany jest również brak informacji odnoszących się do hipotezy badawczej, zakładającej, że „EGT indukuje efekt neuroprotekcyny pełniąc rolę cząsteczki sygnałowej”. Brakuje również uzasadnienia ocenianego przez Doktoranta wpływu EGT na przejście epitelialno-mezenchymalne komórek linii SH-SY5Y. Dziwi również brak podjęcia tematu indukowania autofagii przez EGT oraz inne nutraceutyki, w sytuacji opublikowania przez Doktoranta obszernej pracy przeglądowej na ten temat w *In J Mol Sci* w 2022 roku, w której jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym. Autor nie uzasadnia również celowości wykorzystania w swoich badaniach chlorku litu, substancji o rygorystycznie ograniczonym zastosowaniu w medycynie. Pomimo iż większość w/w treści została omówiona w rozdziale *Dyskusja*, celowe byłoby ich częściowe przeniesienie do *Wstępu*. Z kolei, ze względu na szeroki wachlarz badanych i analizowanych przez Autora czynników wpływających na działanie EGT w komórkach, zasadne byłoby ich usystematyzowanie i zaprezentowanie w zbiorczym schemacie lub tabeli.

Cel pracy został przez Doktoranta jasno sprecyzowany i koncentruje się na „ustrukturyzowaniu i uzupełnieniu dostępnych danych na temat neuroprotekcynowego działania EGT”, wykorzystując jako materiał badawczy linie komórkowe SH-SY5Y i HepG2 oraz stosując zaawansowane techniki biologii molekularnej. Ponadto, Doktorant sformułował hipotezę

badawczą zakładają, że „EGT indukuje efekt neuroprotekcyny pełniąc rolę cząsteczki sygnałnej”.

Autor w większości rzetelnie przygotował rozdział *Materiały i metody* (16 stron), który podzielił na 15 podrozdziałów. Można jednak dyskutować nad takim rozdzieleniem treści, gdyż ich usystematyzowanie na podrozdziały główne i podrozdziały niższego rzędu, zwiększyłoby ich przejrzystość. Podobny efekt porządkujący wywarłoby dodanie spisu zastosowanych w badaniach odczynników. Pewne zastrzeżenia budzi również brak szczegółowych informacji dotyczących obliczeń całkowitej zdolności antyoksydacyjnej EGT w testach bezkomórkowych oraz temperatury inkubacji prób z AAPH. Ponadto, nie podano informacji na temat liczby powtórzeń prób i eksperymentów w przeprowadzonych testach. Należy jednak podkreślić, że do realizacji celu pracy i weryfikacji hipotezy badawczej, Doktorant zastosował wymagające umiejętności eksperymentalnych techniki biologii molekularnej, w tym testy bezkomórkowe ABTS i FRAP z użyciem 4 różnych oksydantów i 4 antyoksydantów referencyjnych, analizy komórek z wykorzystaniem 5 sond fluorescencyjnych redoks, analizy rozkładu faz cyklu komórkowego, analizy procesu apoptozy oraz autofagii, w tym na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego, czy analizy aktywności wybranych transporterów z rodziny ABC. Tak szeroko zakrojone badania wymagają zdolności planowania eksperymentów i efektywnej organizacji pracy oraz samodzielności w prowadzeniu pracy naukowej. Analiza statystyczna uzyskanych wyników jest odpowiednio dobrana, jednak Autor powinien zdefiniować wartości „n” w zastosowanych testach.

Wyniki pracy (41 stron) są przedstawione w formie opisowej oraz graficznej. Ryciny (38) są w znakomitej większości wieloskładowe i starannie przygotowane. Treści rozdziału *Wyniki* są podzielone na 4 podrozdziały. W mojej opinii, zastosowany przez Doktoranta podział na 4 podrozdziały nie jest korzystny, gdyż nie odpowiada mnogości analizowanych parametrów, co utrudnia odbiór prezentowanych treści. Rezultaty zaprezentowane w pierwszym podrozdziale ukazują EGT jako efektywnego przeciwutleniacza, z aktywnością porównywalną do referencyjnych przeciwutleniaczy w zależności od zastosowanego testu analitycznego. Wyniki badań prezentowane na początku drugiego podrozdziału stanowią uzasadnienie wyboru stężeń EGT oraz oksydantów do dalszych badań. Na kolejnych stronach Autor przedstawia rezultaty dokumentujące protekcyjne działanie EGT wobec komórek linii SH-SY5Y oraz HepG2 poddanych działaniu różnych oksydantów, wybranych chemioterapeutyków oraz lipopolisacharydu i chlorku litu, które generują reaktywne formy tlenu. Następnie prezentowane są wyniki analiz oceniających wpływ EGT na: przeżywalność komórek z wykorzystaniem metody redukcji resazuryny, poziom reaktywnych form tlenu z wykorzystaniem 5 sond fluorescencyjnych, poziom tlenu azotu (z sondą fluorescencyjną DAF-FM), proces apoptozy z teście z jodkiem propidyny i barwnikiem Hoechst 33342, poziom ATP, proces autofagii w

oparciu o liczebność endogennych wakuol autofagowych, poziom fosforylacji białek GSK3 β (Ser 9) i p-ULK1 (Ser758), poziom białek markerowych przejścia epithelialno-mezenchymalnego, poziom białek mTOR i GSK3 β , poziom metalotionein, poziom transportera SLC22A4 i ekspresji genu *slc22a4*, czy poziom wybranych białek z rodziny ABC. Prezentacja wyników badań jest bardzo szczegółowa, niemniej jednak, niedosyt w ich analizie wzbudza brak usystematyzowania tak licznych rezultatów w odniesieniu do analizowanych parametrów, jak również wzajemnych korelacji. Ponadto, zastosowanie w badaniach komórek raka wątrobowokomórkowego generuje pytanie, czy i w jakim stopniu można odnieść uzyskane rezultaty do oceny neuroprotekcynnego działania EGT, ze szczególnym uwzględnieniem jej roli jako cząsteczki sygnałowej. Kolejne pytanie dotyczy związku między przeciwutleniającą i neuroprotekcynną aktywnością EGT, a indukowanym nią statystycznie istotnym spadkiem poziomu białek ZB1 i ZO1 w komórkach linii SH-SY5Y, sugerującym stymulujący wpływ EGT na przejście epithelialno-mezenchymalne. Co więcej, potwierdzony przez Doktoranta wielopoziomowy cytochronny efekt EGT wobec komórek HepG2 poddanych m.in. działaniu chemioterapeutyków, może z kolei budzić niepokój o potencjalne skutki stosowania EGT jako nutraceutyka przez osoby z chorobą nowotworową. W mojej opinii, efekt antyapoptotyczny EGT względem komórek linii SH-SY5Y, które Autor analizował na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego, powinien zostać udokumentowany mikrofotografiami. W tekście oraz w opisach rycin Autor skrupulatnie podaje wartości średnich arytmetycznych wraz z odchyleniem standardowym oraz wartości „n”, np. n=3 (Ryc. 3, str. 36), jednak w rozdziale *Materiały i metody* (str. 19-34) nie definiuje co „n” oznacza, co utrudnia jednoznaczną interpretację wyników.

Dyskusja (27 stron) uzyskanych rezultatów badań została przeprowadzona w sposób rzeczowy na tle 130 pozycji literatury z 232 zastosowanych do przygotowania rozprawy. Zacytowane prace w większości opublikowano w ostatnich 5 latach, co świadczy o dobrym rozeznaniu tematu przez Doktoranta oraz aktualności tematyki badań. Autor nie uniknął jednak błędu powtórzeń szczegółowego opisu uzyskanych wyników, w tym przytaczania wartości zastosowanych stężeń czy odwoływania się do wyczerpująco opisanych w wynikach rycin, w miejsce przygotowania stosownych zestawień tabelarycznych. Ponadto, brak rozdzielenia treści *Dyskusji* na tematyczne podrozdziały oraz wspomniany brak zbiorczych zestawień tabelarycznych, np. zestawień rezultatów uzyskanych w danych testach dla obu linii komórkowych, utrudnia ich odbiór. Zwracam zatem uwagę na konieczność przerezegowania treści zawartych w rozdziale *Dyskusja* w trakcie przygotowania manuskryptu publikacji.

Kończącą część rozprawy doktorskiej stanowi *Podsumowanie*, które Autor przygotował w formie ciągłego tekstu. W mojej opinii, prezentacja wniosków sformułowanych w tematycznych

punktach w odniesieniu do uzyskanych wyników, byłaby korzystniejszym podsumowaniem dysertacji.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska mgra Michała Rakowskiego jest napisana dobrym językiem naukowym, ze starannością o stronę edytorską. Autor nie ustrzegł się jednak błędów interpunkcyjnych, np. odczuwalny jest brak konsekwencji w stosowaniu przecinków przed spójnikami przeciwstawnymi, literówek, np. str. 8 „(...) akumulacja w łańcuch troficzny” zamiast „(...) akumulacja w łańcuchu troficzny”, czy zamiennego stosowania „ilość” i „liczba” przy rzeczownikach policzalnych, np. „ilość komórek”, czy „ilość wakuol” w miejsce „liczby komórek” oraz „liczby wakuol”. Numeracja kolejnych rozdziałów prezentowanych w *Spisie treści* oraz w treści pracy, począwszy od rozdziału *Wstęp*, nie jest prawidłowa, gdyż rozdziałowi *Wstęp* Autor błędnie przypisał cyfrę VI, w miejsce cyfry V. W *Wynikach*, tabela opisana jako numer 3 (str. 49), powinna mieć numer 4. Zwracają uwagę również niedociągnięcia w precyzji zastosowanych terminów, np. „rozluźnienie aorty” (str. 82 i 93), „tkanka płucna” (str. 86), „tkanka jelita cienkiego” (str. 89), „skracanie jelita grubego” (str. 94), „traktowanie hepatocytów” (str. 96) czy „odporność komórek na metale ciężkie” (str. 100). Przykładem braku precyzji jest również stwierdzenie Autora - „transporter SLC22A4 występuje powszechnie w komórkach organizmu ludzkiego” (str. 14), poparte przykładami występowania tego kluczowego dla EGT transportera wyłącznie w komórkach nowotworowych, takich jak linii komórkowej glejaka wielopostaciowego U-138, chłoniaka U-698 czy białaczki monocytowej THP-1. W tym miejscu Doktorant powinien podać informacje na temat występowania transportera SLC22A4 w komórkach prawidłowych, np. odwołując się do publikacji Cheah & Halliwell w *Redox Biology* z roku 2021 (doi: 10.1016/j.redox.2021.101868). Ponadto, Autor konsekwentnie nadużywa terminu „modulacja” w miejsce jednoznacznego stwierdzenia *wzrostu* bądź *spadku* analizowanej aktywności czy wpływu *hamującego* lub *stymulującego* wywieranego przez EGT na dany proces. Powyższa uwaga w szczególności odnosi się do *Dyskusji*, *Podsumowania* oraz *Streszczenia*.

Ocena końcowa

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgra Michała Macieja Rakowskiego pt. „*Ocena właściwości antyoksydacyjnych ergotioneiny i jej potencjalnej roli jako czynnika przeciwdziałającego neurodegeneracji*”, przygotowana pod opieką naukową Pani dr hab. Agnieszki Grzelak, jest wartościowym osiągnięciem naukowym. Pomimo przedstawionych przeze mnie uwag i zastrzeżeń, pragnę podkreślić, że oceniana dysertacja jest nowatorska i w rzetelny sposób prezentuje przeprowadzone przez Doktoranta badania. Temat podjęty w rozprawie jest ważny z uwagi na trwające poszukiwania związków zapobiegających lub

opóźniających neurodegenerację, które umożliwiłyby rozwinięcie nowych strategii terapeutycznych w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Tematyka rozprawy wpisuje się w dziedzinę nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Reasumując, przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia kryteria i wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 190 ust. 3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku *Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce*, Dz.U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.) w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. W związku z powyższym, wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne, o dopuszczenie mgra Michała Macieja Rakowskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Poznań, 28.02.2024 r.



Lucyna Mrówczyńska

