

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

**pt., „Ocena właściwości antyoksydacyjnych ergotioneiny i jej potencjalnej roli jako czynnika przeciwdziałającego neurodegeneracji”  
wykonanej przez mgr Michała Rakowskiego  
pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Grzelak**

1

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Michała Rakowskiego dotyczy oceny właściwości antyoksydacyjnych i aktywności biologicznej ergotioneiny w ujęciu działania neuroprotekcijnego tego związku.

Ergotioneina (EGT) jest substancją pochodzenia naturalnego i jest składnikiem diety. Za transport i dystrybucję ergotioneiny w tkankach w organizmie człowieka odpowiada transporter kationów organicznych typu 1 (OCTN1). Poziom magazynowania ergotioneiny w tkankach jest zróżnicowany i zależy od ekspresji transportera OCTN1. Wysoką ekspresję transportera i tym samym wysoki poziom ergotioneiny wykazano dla niektórych komórek potencjalnie narażonych na stres oksydacyjny czy stan zapalny, np. komórek krwi, szpiku kostnego, mózgu, tkanek oka czy wątroby. Stężenie ergotioneiny w różnych tkankach jest zmienne i może zależeć od wieku, stanu zdrowia czy występowania zaburzeń patologicznych.

Ergotioneina została odkryta ponad 100 lat temu, ale nieustannie jest przedmiotem badań naukowych, w tym badań klinicznych. Substancja ta została uznana za bezpieczną do stosowania jako dodatek do żywności lub jako suplement diety. Uważa się, że głównym zadaniem biologicznym ergotioneiny jest aktywność antyoksydacyjna, w tym hamowanie powstawania reaktywnych form tlenu oraz reakcje z nimi. W ten sposób może ona ochraniać komórki i tkanki przed działaniem toksycznych substancji utleniających i mutagennych, jonów metali, nadtlenu wodoru i wolnych rodników. Ochronną rolę ergotioneiny opisuje się dla chorób, w których dominuje stres oksydacyjny i stan zapalny. Prozdrowotne znaczenie ergotioneiny wykazano min. w przypadku cukrzycy, gdzie związek ten chroni komórki śródbłonna naczyniowego przed stresem oksydacyjnym wynikającym z hiperglikemii. Suplementacja ergotioneiną może osłabiać niekorzystne skutki niedokrwienia i reperfuzji. Wiele wyników badań sugeruje, że ergotioneina może chronić tkanki mózgu i układu nerwowego przed uszkodzeniami wynikającymi ze stresu oksydacyjnego czy stanu zapalnego, stymuluje neurogenezę i dojrzewanie neuronów, osłabia procesy neurodegeneracyjne w tym dysfunkcje mitochondriów czy gromadzenie amyloidu.

Hipoteza badawcza pracy doktorskiej mgr Michała Rakowskiego zakładała, że ergotioneina indukuje efekt neuroprotekcyny pełniąc rolę cząsteczki sygnałowej. Opisane w pracy badania mają charakter modelowy *in vitro*. Szczegółowe cele pracy dotyczyły:

1. oceny potencjału antyoksydacyjnego w porównaniu do innych antyoksydantów różniących się mechanizmem działania
2. wyjaśnienia mechanizmu działania neuroprotekcijnego w komórkach nerwiaka poddanych działaniu związków utleniających
3. oceny właściwości ochronnych i sygnalizacyjnych w komórkach raka wątrobowokomórkowego

Aktywność i mechanizmy działania EGT ocenione były w modelu bezkomórkowym (aktywność antyoksydacyjna) oraz w modelu komórek eukariotycznych ludzkiego nerwiaka zarodkowego SH-SY5Y i komórek raka wątrobowokomórkowego HepG2. Obie wybrane linie są komórkami nowotworowymi izolowanymi z ludzkich nowotworów. Dlaczego te modele komórek zostały wybrane do badań w odniesieniu do oceny efektów neuroprotektoryjnych ergotioneiny?

2

W badaniu zastosowano wiele metod aby zrealizować postawione cele, wybór metod wydaje się być uzasadniony. Do oceny potencjału antyoksydacyjnego EGT w roztworach zastosowano metodę redukcji kationorodnika ABTS oraz test FRAP oparty o reakcję redukcji jonu żelazowego. Wynik zdolności antyoksydacyjnej podano w równoważnikach troloksu. Inne metody: ocena przeżywalności komórek z zastosowaniem resazury (SH-SY5Y) i metody akumulacji czerwieni obojętnej (HepG2), pomiar generacji reaktywnych form tlenu i azotu w komórkach z zastosowaniem sond fluorescencyjnych, analiza cytometryczna faz cyklu komórkowego (LPS, EGT, komórki HepG2), ocena indukcji apoptozy po barwieniu jodkiem propidyny i Hoechst z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego (SH-SY5Y), pomiar poziomu metalotionein z odczynnikiem Ellmana (komórki HepG2), ocena modulacji autofagii, pomiar cytometryczny aktywności transporterów ABCB1 z użyciem kalceiny, Fluo-3 i sondy BCECF-AM, analiza ekspresji wybranych genów metodą Real-Time qPCR, pomiar poziomu wybranych białek metodą western blot (komórki SH-SY5Y i HepG2).

Wyniki opisane w pracy:

1. Pomiar metodą redukcji rodniczka ABTS pokazały, że ergotioneina jest porównywalnie efektywnym antyoksydantem co kwas moczowy, wykazuje jednak istotnie niższą aktywność antyoksydacyjną niż kwas askorbinowy, glutation i L-cysteina. Podobne wyniki obserwowano w obecności oksydantów dichlorowodoru 2,2'-azobis(2-metylopropionamidyny (AAPH) czy wodorotlenku tert-butyłu (TBOOH). Natomiast w obecności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EGT okazała się istotnie silniejszym antyoksydantem niż L-cysteina i istotnie słabszym antyoksydantem niż kwas askorbinowy. Aktywność oksydacyjna EGT w obecności dichromianu (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) była podobna jak kwasu askorbinowego, ale istotnie niższa niż dla kwasu moczowego, glutationu czy L-cysteiny. W teście redukcji żelaza (FRAP) zaobserwowano istotnie niższą aktywność antyoksydacyjną EGT niż kwasu askorbinowego i kwasu moczowego niezależnie od obecności związku utleniającego, za wyjątkiem układu z dichromianem (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) gdzie dla EGT aktywność antyoksydacyjna była istotnie wyższa niż dla kwasu askorbinowego. Obecność związków utleniających obniżyła aktywność antyoksydacyjną EGT, ale nie zaobserwowano istotnych zmian w zależności od związku utleniającego.
2. Ergotioneina po inkubacji przez 24 godziny nie obniżała istotnie przeżywalności komórek nerwiaka (SH-SY5Y) w zakresie stężeń 10 – 200 μM (maksymalne obniżenie 12%). Wykonano oznaczenie przeżywalności komórek traktowanych związkami utleniającymi: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5-150 μM, AAPH 10 – 2000 μM, DETA NONOate 10 – 500 μM, menadion 5 – 100 μM. Spośród badanych związków najmniej toksyczny okazał się H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10% obniżenie przeżywalności), AAPH i DETA NONOate na podobnym poziomie (około 20% obniżenie przeżywalności), najbardziej toksyczny menadion (IC<sub>50</sub>=71 μM). Preinkubacja komórek z ergotioneiną zmniejszyła śmiertelność komórek indukowaną H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AAPH i DETA NONOate, natomiast istotnie nasiliła efekt toksyczny menadionu.

W przypadku komórek raka wątrobowokomórkowego HepG2 oceniono przeżywalność komórek w obecności ergotioneiny w zakresie stężeń 12,5 – 100  $\mu\text{M}$ , i zaobserwowano redukcję przeżywalności o około 20% dla stężenia 50  $\mu\text{M}$ .

W badaniach przeżywalności nie wyznaczono stężenia IC50 dla ergotioneiny. Jak jest uzasadnienie doboru stężeń w przeprowadzonych badaniach, także w odniesieniu do stężeń ergotioneiny w organizmie człowieka (np. we krwi czy w wątrobie)?

3. Generacja reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA) oceniana była w komórkach SH-SY5Y po 24-godzinnej inkubacji z EGT z zastosowaniem sond fluorescencyjnych: H2DCF-DA (różne reaktywne formy tlenu), DHE (anionorodnik ponadtlenkowy), MitoSOX (reaktywne formy tlenu w mitochondriach), DHR124 (nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy, nadtlenoazotyn), DAF-FM (tlenek azotu). Nie obserwowano generacji reaktywnych form tlenu lub azotu w komórkach pod wpływem samej EGT. Natomiast preinkubacja komórek z EGT istotnie obniżała poziom RFT po działaniu H2O2, oraz istotnie obniżyła poziom anionorodnika ponadtlenkowego po działaniu menadionu. Ogólny poziom RFT/RFA czy nadtlenku wodoru istotnie zwiększył się po działaniu donora tlenu azotu DETA NONOate lub AAPH po preinkubacji z EGT. EGT nie wpływa na poziom tlenu azotu w komórkach nerwiaka SH-SY5Y.

W komórkach raka wątrobowokomórkowego Hep-G2, EGT istotnie obniżała generację RFT ogółem, bez wpływu na produkcję H2O2 (poziom anionorodnika ponadtlenkowego nie był mierzony). Obserwowano także istotnie zwiększony poziom tlenu azotu w komórkach Hep-G2 pod wpływem EGT. Jaki może być mechanizm generacji tlenu azotu zależnej od EGT w komórkach HepG2? Prawdopodobnie jest to stymulacja syntazy NO (NOS) o czym pisze Doktorant w omówieniu wyników dotyczących LPS (str. 96). Wyjaśnieniem może być także działanie EGT wobec kompleksów dinitrozylo-ditiolo-żelazowych (DNIC) prowadzące potencjalnie do uwolnienia NO, ale jest to tylko hipoteza, która nie była weryfikowana w trakcie badań opisywanych w rozprawie doktorskiej.

Wyniki opisane w pracy, wskazują że EGT może być zmiataczem anionorodnika ponadtlenkowego, ale jednocześnie może przyczyniać się do powstawania nadtlenku wodoru. Doktorant odpowiednio omawia te reakcje powołując się na literaturę naukową. Natomiast jakie może być wyjaśnienie wyników uzyskanych dla donora tlenu azotu DETA NONOate? Jeśli zastosowanie DETA NONOate miało posłużyć generacji nadtlenoazotynu to należało do układu dodać generator anionorodnika ponadtlenkowego.

4. Ocena procesu apoptozy wykazała ochronną rolę EGT dla komórek nerwiaka traktowanych H2O2 czy AAPH co spowodowało istotny spadek frakcji komórek nekrotycznych czy komórek na wczesnym etapie apoptozy. W przypadku komórek traktowanych DETA NONOate czy menadionem, ergotamina spowodowała istotne obniżenie frakcji komórek w fazie zaawansowanej apoptozy.
5. Preinkubacja komórek SH-SY5Y z ergotaminą nie wpływa istotnie na działanie litu w ocenie przeżywalności komórek czy generacji reaktywnych form tlenu i azotu, natomiast EGT powoduje spadek ilości komórek wczesnoapoptotycznych w próbach traktowanych litem.
6. Zaobserwowano, że EGT może modulować poziom fosforylacji białka GSK3 $\beta$  (kinaza syntazy glikogenu 3) oraz białka ULK1 w obecności litu w komórkach nerwiaka (wyniki

nie poparte analizą statystyczną). Ponadto analiza wykazała, że EGT nie wpływa na poziom białek modulujących proces makroautofagii i autofagii zależnej od białek opiekuńczych (Hsc70, cdk5, LC3-A i LC3-B). Wykazano istotną indukcję poziomu białka GSK3 $\alpha$  i białka mTOR pod wpływem EGT. Nie było efektu EGT na poziom białka GSK3 $\beta$  w komórkach nerwiaka wcześniej traktowanych litem.

7. Wykazano istotne obniżenie poziomu wakuol autofagowych pod wpływem ergotaminy w komórkach nerwiaka. Podobne wyniki dotyczą komórek raka wątrobowokomórkowego HepG2.
8. W celu analizy potencjału EGT do modulacji szlaku przejścia epitelialno-mezenchymalnego, wykonano analizę poziomu kilku białek (wimektyny,  $\beta$ -kateniny, ZO1, Snail, ZEB1, E-kadheryny) w komórkach SH-SY5Y; nie wykryto ekspresji N-kadheryny, Kludyny-1, Slug), z których dla ZO1 i ZEB1 zaobserwowano istotne obniżenie poziomu po działaniu EGT.
9. Ergotamina w stężeniu 200  $\mu$ M zwiększa ekspresję genu *slc22a4* kodującego białko SLC22A4 transportujące EGT w komórkach SH-SY5Y. Natomiast w komórkach HepG2 EGT nie zmienia ekspresji genu *slc22a4* oraz poziomu białka SLC22A4.
10. Preinkubacja komórek HepG2 z EGT istotnie obniża poziom RFT ogółem oraz poziom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukowanych lipopolisacharydem (LPS). Poziom tlenu azotu istotnie zwiększa się pod wpływem LPS w komórkach HepG2, a preinkubacja z ergotaminą istotnie nasila ten efekt.
11. EGT i LPS nie wpływają na przesunięcie faz cyklu komórkowego HepG2.
12. Ergotamina obniża poziom metalotionein (białka bogate w cysteinę, które wiążą wolne formy tlenu oraz metale, chroniąc tym samym komórki przed uszkodzeniami) w komórkach raka wątrobowokomórkowego HepG2. Jednocześnie w komórkach traktowanych LPS preinkubacja z EGT przywraca poziom metalotionein prawie do wartości kontrolnych (bez LPS).
13. W pracy oceniono wpływ ergotaminy na działanie chemioterapeutyków na komórki HepG2. Zaobserwowano, że preinkubacja z EGT obniża efekt cytotoksyczny doksorubicyny czy cisplatyny. Wyniki sugerują, że EGT może modulować aktywność transporterów z rodziny ABC (ABCB1 i ABCC1), ale trudno jest jednoznacznie wnioskować gdyż w pracy przedstawione są wyniki reprezentatywne bez analizy statystycznej.

Analizowano także wpływ EGT na poziom ekspresji genów transporterów z rodziny ABC (38 genów) oraz poziom białka transporterów ABCC1 i ABCC2. Wykazano wzrost ekspresji genów *ABCA2*, *ABCC1*, *ABCC11* oraz zahamowanie ekspresji genów *ABCB6*, *ABCC5*, *ABCF3* pod wpływem EGT w porównaniu do kontroli. Stwierdzono także istotne zwiększenie poziomu białka ABCC1 pod wpływem EGT.

Wyniki przedstawione w pracy są bardzo różnorodne i rozlegle odpowiadają na postawione cele. W rozdziale Dyskusja uzyskane wyniki są omówione i przedyskutowane w odniesieniu do właściwie dobranych pozycji piśmiennictwa. W omówieniu wyników Doktorant wyjaśnia obserwacje z badania, sugeruje potencjalne mechanizmy odpowiedzialne za obserwowane zjawiska, jednak za mało odnosi się do efektów neuroprotektoryjnych ergotaminy. W rozdziale Podsumowanie zebrane są najważniejsze wyniki i wnioski z badania, które wskazują, że ergotoneina posiada dobre właściwości

antyoksydacyjne i ochronne wobec komórek nerwiaka SH-SY5Y. W modelu komórek raka wątrobowokomórkowego ergotioneina charakteryzuje się właściwościami cząsteczki sygnałowej, jednak na potwierdzenie niektórych wniosków wskazane są dalsze badania (np. sprawdzenie mechanizmu odpowiedzialnego za zwiększone stężenie NO pod wpływem ergotaminy). Nieuprawnione jest sformułowanie, że EGT uwalnia NO z kompleksów DNIC, prowadząc do aktywacji szeregu szlaków sygnalizacji zależnej od NO, w tym do modulacji poziomu białka ZO1 oraz czynnika transkrypcyjnego ZEB1 – wniosek ten jest oparty o wyniki wykonane w tym badaniu na różnych liniach komórkowych.

5

W mojej opinii należy zwrócić uwagę na znaczenie biologiczne uzyskanych wyników, szczególnie jeśli wyniki badań modelowych in vitro mają być odniesione do procesów zachodzących w organizmie. Przykładem może być osłabianie przez ergotaminę efektu cytotoksycznego leków przeciwnowotworowych doksorubicyny i cisplatyny w komórkach raka wątrobowokomórkowego HepG2. Ta obserwacja może wskazywać na konieczność zwiększenia dawek cytostatyków podczas leczenia nowotworu w celu osiągnięcia efektów terapeutycznych.

Rozprawa doktorska mgr Michała Rakowskiego ma formę maszynopisu książki, liczy 122 strony i zawiera wszystkie elementy wymagane dla rozprawy doktorskiej: wstęp, materiał i metody, wyniki, dyskusja, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bibliografia. Wstęp do rozprawy stanowi przegląd literatury naukowej i opisuje syntezę, dystrybucję do tkanek i aktywność antyoksydacyjną ergotioneiny. Natomiast we wstępie zabrakło rozdziału poświęconego tematyce neuroprotekcji, a ocena aktywności neuroprotektoryjnej ergotaminy jest zawarta w hipotezie badawczej pracy doktorskiej. Uzupełnieniem wiedzy mogą być fragmenty tekstu w dyskusji, które mogłyby być przeniesione do wstępu (np. ze strony 83). Piśmiennictwo przygotowane zgodnie ze stylem porządkowym (Vancouver) cytowania, obejmuje 232 pozycje (publikacje z czasopism anglojęzycznych), dobrane właściwie do omawianych treści.

Uwagi:

- do analizy statystycznej wyników zastosowano tylko test t Studenta. Brakuje informacji o sprawdzeniu wymagań do testu t Studenta (normalność rozkładów, homogenność wariancji), nie wiadomo też czy był to test dla prób zależnych czy niezależnych. W wielu przypadkach analizowane były więcej niż 2 grupy co wymagałoby zastosowania analizy wariancji. Ponadto, w niektórych przypadkach należałoby rozważyć zwiększenie liczby powtórzeń z 3 do 5-6 w celu poprawy jakości wnioskowania statystycznego;
- w legendzie Ryciny 5 opisano, że stężenia związków na osi X podane są jako logarytm naturalny a w tytule osi zapisano logarytm dziesiętny (log c);
- zróżnicowane przedstawienie wyników jako średnia arytmetyczna oraz odchylenie standardowe (SD) lub średni błąd średniej (SEM);
- mocno rozbudowany rozdział Dyskusja, chaotyczny układ treści. Część informacji przedstawionych w tym rozdziale nie dotyczy bezpośrednio omówienia wyników prezentowanych w pracy np. znaczenie ergotaminy w przeciwdziałaniu skutkom hiperglikemii;
- we wstępie (str. 14) informacja o powszechnym występowaniu transportera SLC22A4 w tkankach i komórkach organizmu ludzkiego poparta jest danymi z ludzkich linii komórkowych nowotworowych;

- w przypadku gdy na początku zdania występuje liczba, liczbę należy zapisać słownie (np. str. 26)


W podsumowaniu stwierdzam, że praca doktorska magistra Michała Rakowskiego jest wartościowa i wnosi wartości poznawcze uzupełniające dotychczasową wiedzę na temat ergotioneiny. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668). Przedkładam Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne wnioszek o dopuszczenie mgr. Michała Rakowskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

6

Łódź, 22 luty 2024 roku

Bogusława Luzak

Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi  
Uniwersytatu Medycznego w Łodzi

  
dr hab. n. med. Bogusława Luzak  
Profesor Uczelni