

Dr hab. Magdalena Jaszek  
Zakład Biochemii  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie- Skłodowskiej  
W Lublinie

## **Recenzja**

### **Rozprawy doktorskiej Pani mgr Agaty Grzywacz-Kisielewskiej p.t. „ Ocena skuteczności działania przeciwzapalnego ekstraktów wybranych gatunków grzybów jadalnych i ich biomasy z zastosowaniem technik biologii molekularnej”**

Recenzowana praca dotyczy bardzo ważnego tak pod względem poznawczym jak i aplikacyjnym problemu poszukiwania nowych naturalnych preparatów o właściwościach biomedycznych ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów ich działania. Gatunkami wykorzystanymi przez Doktorantkę jako źródło materiału biologicznego były grzyby jadalne: *Imleria badia*, *Cantharellus cibarius* i *Agaricus bisporus*.

Organizmy będące przedmiotem doświadczeń opisywanych w przedstawionej rozprawie doktorskiej, zostały wyposażone przez naturę w wiele unikatowych właściwości. Z punktu widzenia współczesnej nauki szczególnie ważne jest bogactwo wytwarzanych przez nie metabolitów zarówno pierwotnych jak i wtórnych oraz możliwość namnażania ich biomasy w wystandaryzowanych warunkach laboratoryjnych. Bogactwo szczepów jak i ciągle zwiększająca się ilość aplikacyjnych zastosowań preparatów grzybowych sugeruje zasadność ciągłego poszukiwania metod stymulacji ich metabolizmu w kierunku uzyskania zamierzonych efektów biochemicznych. Jedną z możliwości jest zastosowanie różnorodnych czynników modulujących wzrost grzybni np. suplementacji hodowli związkami cynku, czy kwasem  $\alpha$ -linolenowym, co zostało wykorzystane przez Doktorantkę. Wiele grzybowych metabolitów, zarówno podstawowych jak i wtórnych jest wykorzystywanych jako substancje biomedyczne. Obserwowane zainteresowanie wprowadzaniem nowych, efektywnych związków m.in. do przemysłu farmaceutycznego stymuluje zarówno poszukiwanie nowych czynników bioaktywnych pochodzenia naturalnego jak i badanie mechanizmów ich działania. Z powyższych względów uważam, że podjęcie przez Doktorantkę tematyki badań określonych zaproponowanym tytułem pracy jest w pełni uzasadnione.

Przedstawiona rozprawa doktorska została przygotowana w układzie klasycznym typowym dla prac eksperymentalnych. Liczy 96 stron zasadniczego tekstu, 18 stron spisu 151 pozycji piśmiennictwa oraz 5 fotografii, 8 tabel i 30 rycin przedstawiających wyniki oryginalnych badań doktorantki. Rozprawa została starannie przygotowana pod względem językowym. Autorka nie uniknęła jednak pewnych błędów edytorskich czy stylistycznych.

Praca została podzielona na XII rozdziałów (rozdział XIII to kopie publikacji związanych z tematem rozprawy, których Doktorantka jest współautorem).

**Streszczenie** zostało przedstawione w wersji polskiej i angielskiej. Jego treść stanowią podstawowe informacje na temat sformułowanego celu pracy, zastosowanej metodyki badawczej, badanych parametrów oraz wyników uzyskanych w wyniku realizacji planu eksperymentalnego. Rozdział ten pozwala na szybkie zapoznanie się z zakresem tematyki podjętej w rozprawie oraz zasadnością przeprowadzenia przez doktorantkę badań dotyczących oceny skuteczności działania przeciwzapalnego ekstraktów z owocników wybranych gatunków grzybów jadalnych i ich biomasy zaproponowanymi technikami biologii molekularnej.

**Wstęp**, w skład którego według doktorantki wchodzi jedynie rozdział 3.1 dotyczący opisu procesów zapalnych w organizmie oraz 3.2 opisujący transdukcję sygnału w procesie zapalnym w mojej ocenie powinien zawierać także rozdziały IV i V, które należałoby włączyć w postaci podpunktów. Rozdziały te zawierają typową dla Wstępu syntezę wiadomości dotyczącą tematyki pracy sporządzoną na podstawie dostępnych danych literaturowych. Dlatego według mojej oceny zbędne było w tym przypadku wyodrębnianie oddzielnych rozdziałów pracy. Fakt ten nie obniża oczywiście merytorycznej wartości tych rozdziałów, a jedynie niepotrzebnie komplikuje konstrukcję pracy. Dlatego w mojej ocenie pozwolę sobie na odniesienie się do **Wstępu** jako rozdziałów III, IV i V.

Rozdziały te dobrze wprowadzają czytelnika w problematykę podjętą w rozprawie oraz stanowią cenne źródło aktualnego piśmiennictwa dotyczącego przedmiotu zaplanowanych i przeprowadzonych w pracy eksperymentów. W rozdziale III doktorantka opisuje zjawisko reakcji zapalnej organizmu, oraz mechanizmy odpowiedzi odpornościowej humoralnej oraz komórkowej. Scharakteryzowane zostały w tym miejscu również problemy związane z wygaszaniem stanu zapalnego, takie jak niedobór antyoksydantów, pierwiastków o zdefiniowanych właściwościach przeciwzapalnych, takich jak cynk czy selen, awitaminozy czy procesy związane ze starzeniem się organizmu. Opisana została też w sposób syntetyczny transdukcja sygnału w procesie zapalnym ze szczególnym uwzględnieniem parametrów

analizowanych w pracy takich jak NF- $\kappa$ B ( *nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells*), COX-2 (cyklooksygenaza), cPGES (cytozolowa forma syntazy prostaglandyny E2), AHR (receptor węglowodorów aromatycznych) oraz czynnik jądrowy Nrf2. Pewien niedosyt recenzenta budzi w tych fragmentach brak przejrzystych schematów graficznych związanych z prezentowaną tematyką. Rozdział IV zawiera szczegółowy przegląd literatury dotyczącej metabolitów grzybowych. Autorka opisała znaczenie i właściwości polisacharydów grzybowych zwłaszcza w kontekście biomedycznym. Scharakteryzowała znaczenie i właściwości protein grzybowych. W tym podpunkcie jednak moim zdaniem warto było oddzielić wolne aminokwasy od białek (którymi one nie są) i w ten sposób doprecyzować ujęcie tematu. Opisane zostały również szczegółowo kwasy tłuszczowe, związki fenolowe, związki indolowe, witaminy, terpenoidy oraz wchodzące w skład komórek grzybowych pierwiastki takie jak cynk, miedź czy selen. W przypadku opisu dotyczącego miedzi zabrakło enzymu charakterystycznego dla grzybów jakim jest lakaza, która również w swojej cząsteczce zawiera miedź. W rozdziale tym Doktorantka odniosła się także do stabilności związków grzybowych o charakterze przeciwzapalnym w zależności od warunków ich przechowywania czy przetwarzania.

Moim zdaniem część wiadomości zawartych w tym rozdziale mogło zostać przedstawiona w postaci tabel co umożliwiłoby np. zamieszczenie większej ilości wzorów związków a nie jedynie kilku wybranych przykładów i jednocześnie poprawiłoby w moim odczuciu przejrzystość tego rozdziału. W dalszej części pracy (rozdział V) Autorka przedstawiła charakterystykę materiału biologicznego będącego przedmiotem pracy. Szczególny nacisk położony został w tym przypadku na opis składu owocników poszczególnych gatunków co jest ważne ze względu na cel badawczy prezentowanej rozprawy doktorskiej. W rozdziale 5.2 pisząc o właściwościach bioaktywnych „lakazy” Doktorantka miała zapewne na myśli lakazę (EC 1.10.3.2) oksydazę polifenolową, która jest typowym enzymem grzybowym.

Oceniając całościowo rozdziały III, IV i V uważam, iż korzystne pod względem merytorycznym byłoby pewne skrócenie rozdziałów IV i V, a rozbudowanie rozdziału III. Pragnę podkreślić, że mimo wymienionych wcześniej uwag, z których oczywiście część ma charakter subiektywny pozytywnie oceniam wkład Doktorantki w opracowanie opisywanych rozdziałów. Wykazała się Ona również znaczącą wiedzą dotyczącą prezentowanego tematu oraz umiejętnością starannego doboru źródeł literaturowych związanych z tematem pracy.

**Cel pracy** zawiera zwięzłą propozycję koncepcji eksperymentalnej będącej racjonalną odpowiedzią na zagadnienia pojawiające się w poprzednich rozdziałach. Sformułowany został

jeden cel nadrzędny, czyli określenie mechanizmów aktywności przeciwzapalnej ekstraktów pochodzących z materiału grzybowego: owocników i biomasy pozyskanej z kultur *in vitro* trzech gatunków grzybów jadalnych (*I. badia*, *C. cibarius*, *A. bisporus*), w tym również hodowanych na podłożach wzbogacanych w związki cynku czy kwasu  $\alpha$ -linolenowego.

**Materiały i metody** odpowiadają zadaniom badawczym postawionym w celu pracy. Zaproponowane przez doktorantkę techniki eksperymentalne pozwoliły na wykonanie analiz koniecznych do realizacji zaprojektowanego przez Doktorantkę planu doświadczalnego. Obejmują one zarówno opis przygotowania wykorzystanych preparatów grzybowych jak i zastosowanych technik biologii molekularnej. Źródłem substancji o potencjalnym działaniu przeciwzapalnym były zarówno owocniki jak i biomasa grzybowa namnażana w kulturach *in vitro*. Doktorantka zaproponowała dla każdego z gatunków grzybów odmienne parametry eksperymentalne. W przypadku *I. badia* podłoża hodowlane były wzbogacane poprzez dodatek wodorosparginianu cynku w stężeniu 100 mg/L. W kulturach *C. cibarius* zastosowano suplementację siarczanem cynku (VI) w stężeniu 87,23 mg/L oraz wodorooasparaginianem cynku w stężeniu 100 mg/L, a podłoże do hodowli *A. bisporus* zmodyfikowano kwasem  $\alpha$ -linolenowym (ALA) w stężeniu 0,1 g/L. Hodowle kontrolne stanowiły w każdym przypadku kultury namnażane na czystych podłożach płynnych wg Oddoux.

Do badania właściwości przeciwzapalnych każdego z gatunków zadedykowana została też inna linia komórkowa. Komórki mysich makrofagów RAW 264.7 wykorzystano do oznaczenia właściwości ekstraktów z owocników i biomasy *I. badia* (inkubacja komórek z 40  $\mu$ L/mL przez 24 h). Ludzkie nowotworowe komórki nabłonka płuc A549 inkubowano z ekstraktami z biomasy *C. cibarius* w ilości 20  $\mu$ L/mL przez 24 h. Ludzkie nowotworowe komórki nabłonka jelita CaCo-2 inkubowano z ekstraktami z biomasy *A. bisporus* w ilości 25  $\mu$ L/mL przez 24 h. W rozdziale 7.3.1 nie wspomniano jednak o zastosowaniu ekstraktów z hodowli suplementowanych jonami cynku lub kwasem ALA co wydaje mi się pewnym niedopatrzeniem. Warto byłoby wyjaśnić również dlaczego w przypadku komórek RAW 264.7 do kontroli dodawano PBS, a w przypadku komórek A549 i CaCo-2 kontrole stanowiły komórki inkubowane z etanolem. Pomyłką edytorską wydaje się również być użycie sformułowania „kultury mycelialne” w odniesieniu do hodowli komórkowych wykorzystanych w prezentowanych eksperymentach ( rozdział 7.3).

Niedosyt recenzenta w przypadku opisu planu badawczego budzi brak krótkiego wyjaśnienia w manuskrypcie kryteriów wyboru dotyczących zarówno decyzji odnośnie zastosowania tych konkretnych linii komórkowych, oznaczanych markerów prozapalnych, ilości zastosowanych ekstraktów grzybowych oraz konkretnych modyfikacji warunków hodowli w przypadku każdego z gatunków. Na podstawie jakich danych wybrano właśnie te warianty eksperymentalne. Wiadomości te w moim odczuciu powinny zostać doprecyzowane. Z opisu metod wynika również, że w przypadku *C. cibarius* i *A. bisporus* w eksperymentach z wykorzystaniem linii komórkowych zastosowano jedynie ekstrakty z biomasy uzyskanej z kultur *in vitro*, a jedynie w przypadku *I. badia* zastosowano również ekstrakt z owocników. Opis ten nie odpowiada dalszym fragmentom pracy gdzie doktorantka opisuje wyniki np. „Ekspresja białek COX-2, receptora FP oraz Nrf2 w komórkach CaCo-2 aktywowanych LPS i/lub TNF- $\alpha$  oraz suplementowanych ekstraktami z **owocników i biomasy** z kultur *in vitro* *A. bisporus*”. Dobrze byłoby z punktu widzenia czytelnika doprecyzować w jakich przypadkach jaki rodzaj preparatu został wykorzystany i dlaczego. Poza parametrami technicznymi wykonanych eksperymentów Autorka opisała również szczegółowo sposób opracowania statystycznego uzyskanych wyników.

**Wyniki** zostały podzielone przez Doktorantkę na 4 podrozdziały opisujące wzrost biomasy badanych gatunków grzybów w kulturach płynnych *in vitro* oraz wyniki analiz parametrów związanych z oceną właściwości przeciwzapalnych wykorzystanych preparatów grzybowych. Stanowią one kompleksowe i zwarte opracowanie. Ta część rozprawy została przedstawiona w sposób przejrzysty jednak Autorka nie uniknęła nieścisłości takich jak: „zastosowane wzbogacane w związki cynku i kwas ALA pożywki okazały się korzystne dla wzrostu biomasy”- moim zdaniem precyzyjniej byłoby określić każdy czynnik w kontekście konkretnego gatunku grzyba. Podobne nieścisłości dotyczą zgodności pomiędzy opisami wykorzystanych preparatów zaprezentowanymi w rozdziale Materiały i Metody a Wynikami. Dotyczy to podpunktów 7.3.1, 8.3 i 8.4.2 (inne preparaty figurują w opisie metody wykonania eksperymentu, inne w tytułach podrozdziałów a inne w opisach wykresów).

W **Dyskusji** Doktorantka przedstawiła interpretację uzyskanych wyników w oparciu o zaproponowany materiał literaturowy. Po krótkim wstępie przedstawiona została synteza wyników dla poszczególnych gatunków grzybów wykorzystanych jako źródło preparatów o potencjalnym działaniu przeciwzapalnym. Rozdział ten świadczy o tym, że Autorka dobrze orientuje się w opisywanej problematyce badawczej. Przy opisie *I. badia* doszło jednak prawdopodobnie do pomyłki edytorskiej, ponieważ zgodnie z opisem oraz opublikowaną

przez autorkę publikacją naukową gatunek ten był hodowany na podłożach suplementowanych jedynie wodorosparginianem cynku a nie siarczanem cynku oraz wodorosparaginianem cynku. Opis ten w mojej ocenie wymaga wyjaśnienia. Pewien niedosyt budzi również brak próby graficznego podsumowania uzyskanych wyników, co podniosłoby w moim odczuciu przejrzystość tego rozdziału pracy.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zakończona została **Podsumowaniem** wykonanej serii eksperymentów z podkreśleniem nowatorskich elementów pracy. Autorka w przejrzysty sposób zaprezentowała najważniejsze osiągnięcia badawcze pracy przyporządkowując je do poszczególnych gatunków grzybów. Podkreśliła nowatorskie elementy pracy związane z połączeniem właściwości immunoregulacyjnych cynku lub kwasu  $\alpha$ -linolenowego z korzystnymi właściwościami otrzymanych ekstraktów grzybowych. Wyniki zaprezentowanych badań wskazują na potencjał przeciwzapalny badanych ekstraktów grzybowych pochodzących z biomasy *I. badia*, *C. cibarius* i *A. bisporus*, co jest szczególnie ważne w dobie wzrastającego zainteresowania substancjami bioaktywnymi naturalnego pochodzenia. W przypadku zastosowania wzbogacanych w związki cynku ekstraktów z biomasy *I. badia*, najważniejsze wyniki wskazujące na aktywację procesów detoksykacji komórkowej oraz właściwości przeciwzapalne to:

- wyraźne zahamowanie ekspresji białek COX-2, cPGES, NF- $\kappa$ B p50 i NF- $\kappa$ B p65 w komórkach RAW 264.7 aktywowanych LPS
- wzrost ekspresji białka GSTM1 w komórkach RAW 264.7 aktywowanych LPS.
- represja aktywności NF- $\kappa$ B, a także zwiększona aktywność PPAR $\gamma$  w makrofagach aktywowanych LPS.

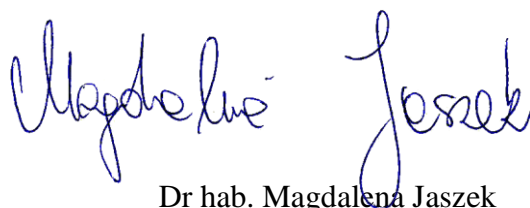
Należy podkreślić, że parametry te zostały po raz pierwszy oznaczone w komórkach RAW 264.7 stymulowanych ekstraktami z biomasy *I. badia*. W przypadku analiz dotyczących potencjału przeciwzapalnego preparatów z owocników oraz biomasy *C. cibarius* wzbogaconych w związki cynku odkryto, iż dodatek LPS powoduje zwiększenie akumulacji cynku w komórkach A549, której efektywność dodatkowo zwiększa się w obecności ekstraktów z *C. cibarius*, oraz że wprowadzenie opisywanych preparatów do kultur komórkowych hamowało ekspresję białek pro-zapalnych COX-2 i cPGES2 oraz białka AHR w komórkach A549 aktywowanych LPS. Warto zaznaczyć, że najbardziej widoczny efekt przeciwzapalny w przypadku *I. badia* i *C. cibarius* wykazywały ekstrakty z biomasy hodowanej na podłożach wzbogacanych dodatkiem cynku. Wyniki zaprezentowane przez Doktorantkę wskazują również na istotne działanie przeciwzapalne preparatów otrzymanych z

biomasy *A. bisporus*. Wprowadzenie ekstraktów z biomasy hodowli kontrolnych oraz kultur wzbogacanych w ALA do hodowli komórek CaCo-2 aktywowanych czynnikami zapalnymi LPS i TNF- $\alpha$  powodowało wzrost ekspresji Nrf2 oraz obniżenie ekspresji białek COX-2 i receptora FP. Ponadto preparaty z otrzymane z grzybni namnażanej na podłożach wzbogacanych w ALA obniżały w tym przypadku zawartość IL-6, co zdaje się potwierdzać ich działanie przeciwzapalne.

Podsumowując stwierdzam, że praca mgr Agaty Grzywacz-Kisielewskiej stanowi oryginalne rozwiązanie konkretnego problemu naukowego i dowodzi zarówno umiejętności planowania i wykonania eksperymentów, jak i opublikowania ich rezultatów w specjalistycznych czasopismach. Doktorantka w pełni zrealizowała zadania przedstawione w celu pracy. Na podkreślenie zasługuje wykorzystanie nowoczesnych technik badawczych oraz szeroki zakres analizowanych parametrów, co stanowi cenny wkład merytoryczny w podjęty temat naukowy. W teoretycznej części rozprawy Autorka udowodniła, że dobrze orientuje się zarówno w tematyce prowadzonych badań jak i literaturze dotyczącej opisywanych zagadnień. Pracę oceniam pozytywnie podkreślając, że znaczna część wyników w niej zaprezentowanych została już opublikowana w czasopismach o zasięgu międzynarodowym a część jest w trakcie publikacji, co również potwierdza nowatorski charakter uzyskanych wyników. Zamieszczone w recenzji uwagi, komentarze oraz pytania nie wpływają na jej pozytywną ocenę. Praca wnosi nowe elementy do wiedzy z zakresu działania przeciwzapalnego preparatów pozyskiwanych z grzybów jadalnych.

Według mojej oceny przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia kryteria stawiane eksperymentalnym pracom doktorskim, a wnioski nie wykraczają poza uzyskane rezultaty.

W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie mgr Agaty Grzywacz-Kisielewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Magdalena Jaszek

Lublin 10.08. 2017