Kraków, 15.05.2019

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM

dr hab. Bożena Muszyńska, prof. UJ
Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład
Botaniki Farmaceutycznej

30-688 Kraków
ul. Medyczna 9
tel. +48 12 620 54 30

Recenzja

Przedstawiona do recenzji praca na stopień doktora nauk biologicznych Pana mgr **Dawida Stefaniuka** zatytułowana: „**Izolacja i charakterystyka nowych niskocząsteczkowych substancji biologicznie czynnych z sekretomu grzyba *Cerrena unicolor***" została wykonana w Zakładzie Biochemii UMCS pod kierunkiem promotora dr hab. Magdaleny Jaszek, prof. UMCS oraz promotora pomocniczego dr hab. Anny Matuszewskiej.

Grzyby podstawkowe stanowią niewielką część królestwa grzybów liczącego przeszło sto tysięcy gatunków, w którym nieustannie są opisywane i dodawane kolejne gatunki. Są to organizmy, na temat których wiedza jest jeszcze mocno ograniczona.

Owocniki grzybów zbierano i stosowano od pradawnych czasów, szczególnie w tradycyjnej medycynie Wschodu oraz jako element medycyny ludowej Zachodu. W Europie po raz pierwszy (już w IV w. p.n.e) właściwości lecznicze grzybów opisał Hipokrates. Pierwsze informacje o stosowaniu grzybów w lecznictwie polskim ukazały się w czasopismach etnograficznych w drugiej połowie XIX wieku. W Farmakopei Polskiej II, znajdują się monografie dotyczące *Faex medicinalis* (*Saccharomyces cerevisiae* – drożdży lekarskich), będących źródłem witamin oraz znajdującymi zastosowanie jako środek do sporządzania tabletek, a w aktualnej Farmakopei XI swoją monografię posiada gatunek nadrewnowy *Poria cocos* (*Polyporaceae*). Mykoterapia jest nauką rozwijającą się od 1974, kiedy to grupa mykologów na konferencji naukowej w Japonii rozpoczęła dyskusje na temat właściwości leczniczych grzybów.

Z tego powodu wyodrębniona została grupa grzybów, która ze względu na swoje właściwości określana jest, jako grzyby lecznicze. Wśród gatunków leczniczych przeważają grzyby z taksonu Basidiomycota (Podstawczaki). Około trzech tysięcy gatunków grzybów jest uznanych za gatunki jadalne, z czego podaje się, że sto jest pozyskiwanych z komercyjnych upraw, ale z tego tylko dziesięć z nich na skalę przemysłową. Potencjał leczniczy grzybów wytwarzających owocniki (w tym też gatunków nadrewnowych) jest co raz lepiej poznany, ale ciągle jeszcze jest bardzo dużo do zrobienia, aby w pełni skorzystać z właściwości medycznych tych organizmów. Ilość zachorowań na choroby nowotworowe i cywilizacyjne i to, że stanowią one przyczynę przedwczesnych zgonów powoduje, że konieczne jest poszukiwanie skutecznych leków, których coraz lepiej poznawanym źródłem są owocniki grzybów.

Przedstawiona do recenzji praca ma szczególne znaczenie, ponieważ skuteczne, celowane, dobrze dokumentowe leki onkologiczne mogą stać się ratunkiem dla pacjentów dotkniętych chorobami nowotworowymi.

Pan mgr Dawid Stefaniuk w swojej rozprawie doktorskiej zajął się tym niezwykle ważnym z punktu widzenia praktycznego tematem, analizując właściwości biologiczne substancji izolowanych z ekstraktów grzyba nadrzewnego *Cerrena unicolor*.

Przedstawione do recenzji opracowanie mgr Dawida Stefaniuka na stopień doktora nauk biologicznych zawarte jest na 212 stronach maszynopisu i podzielone tak, jak wymagane jest od opracowań prac doktorskich, czyli zawiera właściwe elementy:

- Wprowadzenie stanowiące też część teoretyczną
- Cel pracy
- Materiały i metody
- Dyskusję uzyskanych wyników
- Streszczenie w języku polskim i angielskim
- Spis piśmiennictwa, rycin i tabel
- Dorobek naukowy Doktoranta (niestety tylko spis prac).

Układ pracy jest przejrzysty i zrozumiały, co ułatwia w dużym stopniu jej śledzenie i wykorzystanie wyników (może jedynie nie potrzebne jest stosowanie aż 5 poziomów podrozdziałów i ich tytuły można by radykalnie skrócić, dzięki czemu spis treści stałby się krótszy i czytelniejszy). Do pięćdziesiątej strony zawarty został wstęp (część teoretyczna), a następnie przedstawiono cel przeprowadzonych badań. Rozprawa jest udokumentowana aż 242 pozycjami piśmiennictwa w znacznej ilości pochodzącymi z lat 2010-2019 oraz zawiera 46 rycin i 39 tabel.

W pierwszej części pracy, we wstępie mgr Dawid Stefaniuk skoncentrował się na opracowaniu i opisaniu najważniejszych grzybowych substancji biologicznie aktywnych oraz metod ekstrakcji materiału grzybowego i metod analitycznych ze szczególnym uwzględnianiem chromatograficznych.

Następnie Doktorant nakreślił cel swojej rozprawy doktorskiej, którym była izolacja i charakterystyka nowych niskocząsteczkowych substancji biologicznie aktywnych z gatunku grzyba białej zgnilizny drewna *Cerrena unicolor* oraz analiza ich wybranych właściwości biologicznych. Materiał grzybowy, który Doktorant wykorzystał do separacji poszczególnych frakcji był to preparat zawierający zewnątrzkomórkowe metabolity wtórne (ex-LMS) produkowane przez wybrany do badań gatunek w warunkach prowadzonych kultur *in vitro*.

W przedstawionej do recenzji pracy, w celu określenia składu jakościowego badanych preparatów zastosowano techniki analityczne takie jak: spektroskopia w podczerwieni FT-IR, wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią w świetle widzialnym i ultrafiolecie (HPLC-UV-VIS), oraz ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS).

Moim zdaniem jednym z najważniejszych osiągnięć Doktoranta mimo, że marginalnie jest opisane w rozprawie należy uznać opracowanie aparatu własnej konstrukcji do zatężenia pożywek drogą odwróconej osmozy na membranie TFC-75F (Aquafilter Inc. USA), a cenowo jest prawdopodobnie bardzo konkurencyjny w porównaniu do aparatów komercyjnych. Dzięki skonstruowanemu autorsko urządzeniu uzyskiwano zagęszczony materiał do dalszych analiz związków biologicznie aktywnych wydzielanych przez mycelium badanego gatunku do środowiska zewnętrznego, czyli podłoża pohodowlanego. Frakcję tę (extracellular low molecular subfraction – ex-LMS) zamrażano w porcjach po 50 mL w temperaturze -30° i wykorzystywano do dalszych działań preparatywnych. Jest to o tyle ciekawe podejście do wykorzystania grzybni, ponieważ mimo iż powszechnie bada się zdolność remediacyjną grzybów owocnikowych w odniesieniu do środowiska zewnętrznego, to farmaceutyczne aplikacje odnoszą się przeważnie do związków zawartych w mycelium.

Wykorzystanie tej cechy grzybów wytwarzających owocniki czyli zdolności do oddawania enzymów i substancji do środowiska zewnętrznego (w tym przypadku medium pohodowlanego) wskazuje na niezwykły potencjał leczniczy grzybów w warunkach *in vitro*.

W przedstawionej do oceny dysertacji udowodniono, że można pozyskiwać metabolity lecznicze w środowisku zewnętrznym grzybni czyli podłożach, w których prowadzone są ich mycelialne kultury *in vitro*.

Przeprowadzone analizy otrzymanych preparatów niskocząsteczkowych LMS-s1-LMS-s6 i LMS-b1-LMS-b4 wykazały niestety tylko **prawdopodobną obecność różnorodnych** związków należących do białek i peptydów, węglowodanów, związków fenolowych, pochodnych aromatycznych zawierających siarkę, amin oraz nukleozydów. Wśród przebadanych preparatów obserwowano również związki o charakterze przeciwutleniaczy, z których najwyższy potencjał antyoksydacyjny wykazywały frakcje LMS-b2 oraz LMS-s6. I tu moje główne pytanie: **dlaczego nie wykonano analiz metodami w tym, które były stosowane, a w porównaniu ze wzorcami prowadziłyby do uzyskania odpowiedzi, jakie związki są odpowiedzialne za proponowane w pracy działanie biologiczne?**

Godnym podkreślenia jest fakt, że w wykonanych analizach mikrobiologicznych wykazano prawdopodobny synergizm działania izolowanych preparatów dotyczących hamowania wzrostu bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych, jak również zdolność jednego z analizowanych preparatów do hamowania wzrostu bakterii w postaci biofilmu.

Analizy z wykorzystaniem ludzkich komórek nowotworowych wykazały cytotoksyczny oraz antyproliferacyjny potencjał zarówno frakcji wyjściowej, jak i badanych preparatów wobec komórek raka szyjki macicy SiHa oraz CaSki, jak również wpływ na proliferację komórek linii nowotworowej jelita grubego HT-29, raka prostaty PC3, a także piersi MCF7 oraz gruczołu sutkowego MDA-MB-231. Badane preparaty w stosunkowo niewielkim stopniu wpływały na proliferację transformowanej linii prawidłowej jelita grubego CCD 841 CoTr. Przeprowadzone analizy preparatów pozyskanych z końcowych etapów oczyszczania (LMS-s1-LMSs6 i LMS-b1-LMS-b4) wykazały wyraźnie, że w sposób zależny od stężenia hamują one proliferację komórek linii HT-29. Najbardziej obiecujące wyniki otrzymano dla preparatów LMS-s3, LMS-s4 i LMS-s5 efektywnych już przy stężeniach od 25 do 50 μg/mL.

W przedstawionej do recenzji pracy wykazano, że w przypadku oceny niektórych mechanizmów działania przeciwnowotworowego wybranych najbardziej efektywnych preparatów, tj. hamujących migrację komórek nowotworowych (w przypadku frakcji LMSs1) powiązano ich działanie między innymi z wpływem na aktywność MMP-9 (metaloproteinazę macierzy zewnątrzkomórkowej).

W dysertacji wykazano również zdolność oczyszczonych preparatów do hamowania aktywności wybranych proteaz diagnostycznych, w tym enzymów z grupy proteaz

cysteinowych i asparaginianowych. Wykazano również zdolność badanych frakcji LMS-s1 i LMS-s6 do znacznego promowania procesów wykrzepiania ludzkiego osocza krwi. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki pokazują, że badany gatunek *Cerrena unicolor* jest interesującym źródłem nowych związków niskocząsteczkowych o dużym potencjale biomedycznym. Na podkreślenie zasługuje to, że Doktorant (tak jak większość badaczy) nie koncentrował się na grzybni, tylko na medium pohodowlanym, w którym analizował metabolity oddawane do środowiska zewnętrznego.

Z obowiązku recenzenta, mimo nie kwestionowanej wartości naukowej pracy mam pewne uwagi i prośby o wyjaśnienia.

Autor opracowania nie uniknął drobnych niezgrabności zwłaszcza w części teoretycznej, która jest słabszą stroną przedstawionej do recenzji pracy, takich jak:

– wprowadzenie wymaga poprawy stylistycznej i uaktualnienia (dane cytowane z piśmiennictwa naukowego są z 2012 roku lub starsze); pierwsze zdanie: „Grzyby od dawna towarzyszą człowiekowi jako źródło witamin (zwłaszcza z grupy B), minerałów oraz pełnowartościowego białka." To człowiek znał grzyby i zaczął stosować w diecie i lecznictwie oraz są one źródłem witamin, makro- i mikroelementów (czyli biologicznie aktywnych biopierwiastków), a nie minerałów bo to związki nieorganiczne budujące np. skały.

– str. 11 „przypominające bryłkę węgla drzewnego owocniki uważane były za remedium **na** choroby nowotworowe" – przeciw chorobom nowotworowym!

– str. 11 „dane literaturowe.." i w całej pracy: dane z piśmiennictwa naukowego.

– str. 11 podział „preparatów grzybowych" jest błędny, nie dzielimy ich ze względu na **stopień oczyszczenia** i **odziaływań** – tylko ekstrakty lub wyizolowane związki i działanie biologiczne na organizm człowieka w tym lecznicze.

– str. 12 „W zastosowaniach tradycyjnych opisywanych w dostępnych danych literaturowych najczęściej wykorzystywane były i są do tej pory ekstrakty pozyskiwane z całych owocników grzybowych lub sproszkowane owocniki" – zawsze do ekstrakcji są stosowane rozdrobnione owocniki! I co znaczy całe w odróżnieniu od niecałe..?

– str. 12/13 „Najczęściej stosowanymi metodami ich otrzymywania jest ekstrakcja przy użyciu rozpuszczalników organicznych lub wody. Każda z tych metod pozwala na przeniesienie do ekstraktu innego rodzaju substancji. W pierwszej metodzie pozyskiwane są głównie substancje rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych, w drugiej np. polisacharydy grzybowe."– a co z polisacharydami nierozpuszczalnymi w wodzie i w określonym pH?

– str. 15 „działało również osłonowo na tkankę nerek chorych"– powinno być osłaniająco.

– str. 15 „Wolne rodniki są niezwykle reaktywne, a ich oddziaływanie z cząsteczkami biologicznymi może prowadzić do zmiany zarówno struktury chemicznej jak i trwałej utraty funkcji danej cząsteczki, a w konsekwencji starzenia się i śmierci organizmu." – **niezwykle** czyli jak ? Proponuję w pracy naukowej w tym całej rozprawie nie używanie tego typu nic nie wnoszących sformułowań.

– str. 15 „Preparaty pochodzenia grzybowego zdolne są do zmiatania reaktywnych form tlenu takich jak anionorodnik ponadtlenkowy itd." Na następnych stronach podobnie. Jakie preparaty, bo w Polsce jeszcze ich brakuje, chyba, że chodzi o ekstrakty i nie jest potrzebna personifikacja.

– „Dostępne dane literaturowe wskazują." – personifikacja i powinno być dane z piśmiennictwa naukowego.

– str. 19 „o bardziej lub mniej intensywnych **(?)** właściwościach bójczych izoluje się z wielu gatunków grzybów jadalnych bądź niejadalnych uważanych za lecznicze" – czy chodzi działanie bakteriobójcze?

– str. 19 „Grzyby wytwarzają całą **gamę** związków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych, aby przetrwać w swoim naturalnym środowisku i zyskać niezbędną gatunkową przewagę ewolucyjną." – jak wyżej

– str. 32 tytuł tabeli „Przykłady peptydów przeciwgrzybowych", powinien być napisany: Przykłady peptydów o działaniu przeciwgrzybiczym

– Tabela 1 dlaczego zaprezentowane te gatunki grzybów, dane są nieco stare bo do 21 strony wykorzystane jedynie artykuły do 2012 roku!

– str. 33 powinny być dodane politerpenoidy

– str. 39 i inne zamiast z prawej i lewej np. a.) i b.) i niektóre wzory są nie czytelne.

– str. 40 brak w opisie wybranego gatunku autorów go opisujących czyli *Cerrena unicolor* (Bull.) Murrill

– str. 44 „Najbardziej popularną metodą izolacji biologicznie czynnych związków z grzybów wyższych jest ekstrakcja wodna oraz wodno-etanolowa" – to nie jest prawda, bo bardzo często prowadzi się ekstrakcję metanolem, acetonitrylem itd.

– str.47/53 ułożenia złoża/złóż chromatograficznego itd. – powinno być: rodzaju fazy stacjonarnej

– w całej pracy nie l tylko L (np. też mL, μL wg Si)

– TLC wizualizacja chromatogramów słabej jakości i budzi kontrowersje zbyt niska linia startu chromatogramów, sugerująca, że były zanurzone w fazie rozwijającej, co może zaburzać rozdział związków.

– str. 175, Tabela 39 Wpływ ex-LMS, LMS-s oraz preparatów LMS-s1 do LMS-s6 na opóźnienie czasu oraz szybkości krzepnięcia ludzkiego osocza bogato- oraz ubogopłytkowego po czym w tabeli **wykrzepianie, powinno być krzepnięcie!**

– Zbyt długie tytuły rozdziałów (przez co aż 11 stron spisu treści) i zejście do piątego podrozdziału powtarza treści i utrudnia czytanie.

Zaznaczone powyżej niezgrabności w tak obszernej rozprawie nie wpływają w najmniejszym stopniu ocenę merytoryczną przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej Pana mgr Dawida Stefaniuka, wymagają jedynie uwzględnienia w trakcie dalszej prezentacji wyników.

W skład dorobku naukowego Pana Mgr. Dawida Stefaniuka wchodzi 15 prac posiadających współczynnik oddziaływania IF. W mojej opinii szkoda, że do doktoratu nie została dołączona informacja na temat sylwetki Doktoranta, o jego działalności naukowej, a nie tylko lista prac, bo intersująca by była też działalność dydaktyczna, organizatorska, udział w konferencjach naukowych, etc.

Podsumowując należy stwierdzić, że Autor rozprawy zrealizował wszystkie założone cele wykorzystując właściwe narzędzia metodologiczne, analityczne oraz statystyczne.

Pan mgr Dawid Stefaniuk wykazał się też dobrą znajomością piśmiennictwa przedmiotu, bardzo dobrym opanowaniem nowoczesnego warsztatu badawczego/doświadczalnego. Przedstawiona do recenzji praca jest interdyscyplinarna, ponieważ wymagała zdobycia wiedzy z zakresu mykologii, biochemii, biologii molekularnej, chemii analitycznej i zaawansowanej metodyki analitycznej, medycyny, ale też zdolności inżynierskich i konstruktorskich.

Wszystkie trudne elementy celu swojej rozprawy mgr Dawid Stefaniuk w pełni zrealizował, dlatego w mojej opinii przedstawiona do recenzji rozprawa zatytułowana: „Izolacja i charakterystyka nowych niskocząsteczkowych substancji biologicznie czynnych z sekretomu grzyba *Cerrena unicolor*" spełnia wszelkie ustawowe i zwyczajowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej o dopuszczenie Pana mgr Dawida Stefaniuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na niezwykle ważną oraz nowatorską tematykę przedstawionych w rozprawie badań (związki grzybowe wydzielane do podłoży w warunkach hodowli *in vitro*), ich aplikacyjne znaczenie dla skutecznej walki z chorobami cywilizacyjnymi, a przede wszystkim nowotworowymi oraz propozycję autorskiej konstrukcji aparatu do odwrotnej osmozy, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana magistra Dawida Stefaniuka.

Katedra i Zakład
Botaniki Farmaceutycznej UJ CM

dr hab. Bożena Muszyńska, profesor UJ