

OCENA

pracy doktorskiej mgr Marty Kingi Lemieszek pod tytułem
**„Ocena właściwości chemoprewencyjnych kompleksów
węglowodanowo-białkowych izolowanych z *Boletus edulis* (borowik szlachetny). Badania
in vitro i molekularne w modelu komórek raka okrężnicy”**

Badania naukowe prowadzone w Zakład Biologii Medycznej Instytutu Medycyny Wsi imienia Witolda Chodźki w Lublinie, pod kierownictwem prof. dr hab. Wojciech Rzeskiego, ukierunkowane są na ocenę aktywności biologicznej, ze szczególnym uwzględnieniem działania przeciwnowotworowego, substancji syntetycznych oraz pochodzenia naturalnego z zastosowaniem metod *in vitro* i *in vivo* (w tym grzybów leczniczych, a więc badania mykofarmakologiczne), badanie molekularnych mechanizmów działania tych substancji w komórce oraz hodowle komórek ludzkich i zwierzęcych przeznaczone do prowadzenia stosownych eksperymentów.

Głównym i oryginalnym zamierzeniem pracy doktorskiej mgr Lemieszek było zbadanie właściwości chemoprewencyjnych frakcji izolowanych z *Boletus edulis* względem komórek raka okrężnicy. Należy docenić w tym momencie ułożenie pracy w nowoczesnym trendzie badania kompleksów węglowodanowo-białkowych z grzybów (i nie tylko), po okresie zachłyśnięcia się naukowców polisacharydami grzybowymi i ich aplikacją w terapiach przeciwnowotworowych. Pracę doktorantka zrealizowała w kilku etapach obejmujących między innymi wybór frakcji o największym potencjale terapeutycznym, oraz ocenę działania tej frakcji na indukcję apoptozy, przebieg cyklu komórkowego i ekspresję białek go regulujących, szlaki przekazywania sygnałów i ekspresję genów ważnych z punktu widzenia działania chemoprewencyjnego, w komórkach NJG. Z tych względów temat pracy doktorskiej uważam za szczególnie trafny, gdyż właśnie znajomość cząsteczek biologicznie aktywnych z grzybów, szczególnie „zaniedbywanych” wielkoowocnikowych, oraz metod ich izolacji, a także badania dobrze dopracowanych powiązań budowy tych związków i ich funkcji w procesach molekularnych, daje nam nowe narzędzia terapeutyczne w erze postcytostatycznej.

Oceniana rozprawa doktorska mgr Lemieszek obejmuje 132 strony, w tym 24 ryciny (rysunki, wykresy i fotografie) we wstępie i w wynikach. Jest podzielona na typowe dla rozpraw doktorskich części, czyli wstęp; cel pracy; część doświadczalną podzieloną na materiały i metody, oraz omówienie wyników badań; dyskusję, wnioski i streszczenie (w tym streszczenie w języku angielskim); spis cytowanej literatury naukowej, uwzględniający najistotniejszą literaturę tematu (zarówno zagraniczną, jak i polską; 386 pozycji), w tym głównie pozycje z XXI wieku. Dodatkowo na stronie 3 doktorantka wymienia swoje pozycje literaturowe, w których częściowo zostały opublikowane uzyskane przez nią wyniki, co jest dodatkowym plusem procesu uzyskiwania stopnia naukowego.

Doktorantka rozpoczyna swoją rozprawę doktorską od przeglądu literatury we wstępie, w którym omawia ogólnie, w oparciu o dane z piśmiennictwa, nowotwory jelita grubego (wraz z ich przyczynami środowiskowymi i molekularnymi mechanizmami ich rozwoju); chemoprewencyjne i przeciwnowotworowe właściwości polisacharydów grzybowych; oraz charakterystykę borowika szlachetnego, z uwzględnieniem jego właściwości prozdrowotnych. Tę część rozprawy mgr Lemieszek omawia według najnowszych danych literaturowych, ale można się nie zgodzić z paroma lukami. Brak jest podkreślenia kluczowej roli mechanizmów epigenetycznych w etiologii nowotworów jelita grubego. Uwagę zwraca zbyt skrótowe, według mnie, omówienie przez doktorantkę, badanych następnie przez nią, kompleksów węglowodanowo-białkowych. Jedynie tło polisacharydowe opisane jest wyczerpująco. Przydałaby się również wzmianka o badaniach etnomykologicznych prawdziwka. Sumarycznie, wstęp jest interesującym i wyczerpującym przeglądem aktualnego stanu wiedzy o planowanych badaniach. Podtrzymuje to moje przeświadczenie, iż doktorantka dokonała dobrego przeglądu literatury, odpowiedniego do realizacji właściwego celu swojej pracy.

Co do celu pracy, to jest on klarowny oraz zwięzły i dobrze wyłożony. Ułatwia także śledzenie przez czytającego następującej części doświadczalnej.

W części doświadczalnej opisała doktorantka szczegółowo materiał do badań oraz metody badawcze zastosowane w pracy. Mam tylko kilka wątpliwości. Czy nie można było użyć także preparatów pozyskanych z grzybów rosnących w Polsce (choćby dla porównania)? Wiadomo, że zawartość oraz dokładny skład substancji biologicznie aktywnych grzyba zależy od bardzo wielu czynników (klony grzyba, niuanse mykoryzowe, skład gleby, klimat i niuanse środowiskowe, rośliny towarzyszące, etc. etc.) i grzyb portugalski może różnić się znacząco od polskiego

odpowiednika. Czy wrzący etanol nie był zbyt radykalnym sposobem izolacji, ze względu na denaturację większości białek, kompleksu polisacharydowo-białkowego? Czy nie rozważano innych metod izolacji (w literaturze są znane)? Bardzo dobre są opisy procedur typu „ocena zdolności ...” związków biologicznie aktywnych, ale już np. brakuje mi wykresów przy metodach chromatograficznych i opisu prób identyfikacji części białkowej kompleksu, nawet, jeżeli była ona nieudana. Urozmaicone metody badawcze świadczą o wszechstronnym i krytycznym podejściu mgr Lemieszek do podjętego problemu badawczego.

W części doświadczałnej „Wyniki” opisała doktorantka rezultaty poszczególnych etapów doświadczeń, szczególnie skupiając się na wpływie frakcji na proliferację komórek raka okrężnicy, określeniu cytotoksyczności frakcji względem prawidłowych kolonocytów, określenie frakcji do indukcji śmierci (czy chodzi o nekrozę?) i apoptozy komórek rakowych, wpływ frakcji na przebieg cyklu komórkowego i ekspresję białek regulujących jego przebieg, wpływ frakcji na przekazywanie sygnałów i wybrane komponenty tych szlaków, wpływ frakcji na poziom ekspresji genów, oraz wyciszenie ekspresji wybranych genów. Wyniki są dobrze opracowane graficznie i statystycznie, choć analizuje się je dość mozolnie i monotonicznie. Zastanawia mnie, dlaczego doktorantka nie zastosowała zróżnicowania kolorystycznego grup wykresów? Szkoda też, że zestawy wykresów nie są całostronicowe, byłyby wtedy łatwiejsze w odbiorze, przy zestawianiu z opisem. Ogólnie, rozdział „Wyniki” czyta się dobrze i, poza powyższymi, raczej drobnymi uwagami, o charakterze zdecydowanie dyskusyjnym, należy uznać go za bardzo dobrą część rozprawy doktorskiej mgr Lemieszek, będącą równocześnie pełną realizacją założonych celów pracy. Należy tu również napomknąć o bardzo dobrze stosowanej w całej rozprawie obróbce statystycznej otrzymanych wyników.

Dość wnikliwa i obszerna jest „Dyskusja” wyników badań własnych, otrzymanych przez doktorantkę, omówionych na tle najnowszych prac innych badaczy. Poza paroma rzeczami do polemiki, należy uznać, że jest ona prowadzona w sposób rzeczowy i krytyczny, świadczący o satysfakcjonującej znajomości zagadnienia. Polemizować można z takimi rzeczami w dyskusji jak:

- opis kompleksu polisacharydowo-białkowego powinien być raczej w wynikach; brak jest porównania tego co dowiedziano się o jego składzie z literaturą;
- zbyt obszerne są rozważania teoretyczne wprowadzające do właściwego porównania wyników uzyskanych przez doktorantkę z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy; dyskusja jest przez to nieco rozdęta;

- bardzo brakuje mi choćby prowizorycznego schematu graficznego rozwoju nowotworu i jego obumierania, z zaznaczonymi punktami oddziaływania badanej przez doktorantkę frakcji; byłaby to taka „wisienka na torcie”.

Rozprawę kończą zwięzłe „Wnioski” i nieco za długie „Streszczenie” oraz jego angielska wersja. Ta część rozprawy nie budzi istotnych zastrzeżeń i jest klarowna.

Drobnuteńkie pomyłki i literówki, przy równoczesnym dopilnowaniu posługiwania się ogromną ilością skrótów i terminologii, oraz dużą ilością cytowań literatury, praktycznie nie mają znaczenia. Istotnych błędów redakcyjnych, językowych czy nomenklaturowych nie zauważyłem.

Powyzsze uwagi i polemiki nie mają wpływu na wysoką merytoryczną wartość pracy doktorskiej i jej ogólną wysoką ocenę pozytywną. Co najwyżej mogą być wzięte pod uwagę przy przygotowaniu pracy do druku. Dla doktorantki zaś powinny stanowić bodziec do dalszego treningu precyzyjnego myślenia, czy wyrażania w pełni, w formie pisanej (a w przyszłości także mówionej) swoich, jak i innych autorów, przemyśleń i hipotez. Cała dysertacja czyta się płynnie i z dużą przyjemnością, tym bardziej, że na polskim „rynku naukowym” jest to jedna z niewielu prac związanych z substancjami czynnymi farmakologicznie z grzybów wielkoowocnikowych.

Reasumując, stwierdzam, że praca doktorska mgr Marty Kingi Lemieszek pod tytułem „Ocena właściwości chemoprewencyjnych kompleksów węglowodanowo-białkowych izolowanych z *Boletus edulis* (borowik szlachetny). Badania *in vitro* i molekularne w modelu komórek raka okrężnicy” w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. Jest dobrze zaplanowana, starannie wykonana i poprawnie napisana. Jest pracą wzorcową, jako praca z dziedziny poszukiwania gatunków grzybów jadalnych i/lub medycznych do zastosowania w terapii oraz z dziedziny nowych substancji biologicznie aktywnych z tych grzybów, a także dobrą pracą z dziedziny opracowywania procedur izolacji nowych związków tego typu. Jest także przykładem rozwiązywania problemu naukowego z wykorzystaniem różnych technik badawczych; zawiera elementy nowości naukowej i dowodzi osiągnięcia zamierzonego celu. Otwiera także perspektywę dalszego rozwoju naukowego mgr Lemieszek w wyznaczonym kierunku (dalsze badania właściwości i funkcji substancji biologicznie aktywnych z grzybów wielkoowocnikowych), a także możliwość praktycznego zastosowania rezultatów przedstawionych badań na obszarze

farmakologicznym i klinicznym, a być może także biotechnologicznym.

Uwzględniając wartość poznawczą rozprawy i wykazaną przez doktorantkę dobrą znajomość problematyki przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr Marty Kingi Lemieszek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie ze względu na wkład pracy, staranność wykonania oraz konkretność uzyskanych wyników w dysertacji doktorskiej proponuję nagrodzić ją, stosownym dla zwyczaju IMW, wyróżnieniem.



dr hab. Krzysztof Grzywnowicz, prof. UMCS

000001353
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Wydział Biologii i Biotechnologii
Instytut Biologii i Biochemii
Zakład Biochemii
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin