



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Bromatologii i Dietetyki

Kierownik

Prof. dr hab. Halina Grajeta

Wrocław 11.07.2022r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Patryka Nowakowskiego pt. "Wpływ ekstraktów z wybranych grzybów jadalnych na komórki glejaka wielopostaciowego"

wykonanej w Zakładzie Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny
Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
pod kierunkiem dr hab. Renaty Markiewicz-Żukowskiej, w dziedzinie nauk medycznych i
nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Nowotwory, od wielu lat są jedną z głównych przyczyn śmiertelności w Polsce i na świecie. Ich leczenie polega z reguły na chirurgicznym usunięciu guza, a następnie w zależności od jego rodzaju i fazy rozwojowej, na stosowaniu chemio- radio- lub immunoterapii. Terapie te wiążą się z występowaniem licznych działań niepożądanych, które pogarszają jakość życia pacjentów. W związku z tym ciągle poszukuje się środków (preparatów) wspomagających leczenie nowotworów jak i łagodzących jego skutki uboczne. Grzyby jadalne i lecznicze ze względu na zawartość różnych składników, także o prozdrowotnym działaniu, są stosowane od lat, w krajach głównie azjatyckich, do leczenia wielu chorób. Stąd też wynika zainteresowanie nimi naukowców jako potencjalnym źródłem związków również o działaniu przeciwnowotworowym. Do tej pory ukazało się wiele prac zarówno przeglądowych, jak i doświadczalnych prowadzonych na różnych modelach, podsumowujących wyniki badań nad wpływem związków zawartych w różnych gatunkach grzybów na hamowanie rozwoju różnych nowotworów (głównie piersi). Rośnie też liczba pojawiających się suplementów diety zawierających ekstrakty z grzybów ale pojawiają się też pytania o bezpieczeństwo ich stosowania, standaryzację, skuteczność, mechanizmy działania i regulacje prawne. W związku z powyższym podjęte przez mgr Patryka Nowakowskiego badania doskonale wpisują się w ogólnoswiatowy trend zainteresowań leczniczymi właściwościami grzybów należących do różnych gatunków.

Rozprawa doktorska mgr Patryka Nowakowskiego została przedstawiona do recenzji w formie cyklu 4 publikacji (2 przeglądowych i 2 oryginalnych) opatrzonych komentarzem o układzie typowym

dla prac doktorskich, napisanym w sposób jasny i logiczny, przez co stanowi bardzo dobre wprowadzenie do analizy załączonych kopii prac.

W rozdziale **Wprowadzenie** doktorant przedstawił w skrócie, w oparciu o piśmiennictwo, zagadnienia, którymi zajął się w swoich badaniach. Zwrócił uwagę na wartość odżywczą grzybów, możliwe ich zanieczyszczenie pierwiastkami toksycznymi, przedstawił ich potencjalne działanie prozdrowotne wynikające z zawartości w nich związków bioaktywnych, ze szczególnym zwróceniem uwagi na ich działanie przeciwnowotworowe. Podkreślił dużą śmiertelność z powodu występowania nowotworów układu nerwowego, w tym glejaka wielopostaciowego, którego leczenie jest niezwykle trudne i mało efektywne. Ten aspekt oraz opisane w licznych piśmiennictwie działanie przeciwnowotworowe różnych gatunków grzybów skłoniło doktoranta do podjęcia swoich badań. We wprowadzeniu opisał też krótko 4 gatunki grzybów, które wytypował do analiz. Były to: Czernidłak kołpakowaty (*Coprinus comatus*), Pieprznik jadalny (*Cantharellus cibarius*), Purchawka chropowata (*Lycoperdon perlatum*) oraz Mleczaj rydz (*Lactarius deliciosus*). W rozdziale **Cel pracy z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej** doktorant podał zasadniczy cel pracy, którym było zbadanie wpływu ekstraktów z wybranych ww. grzybów na komórki glejaka wielopostaciowego w aspekcie ich aktywności przeciwnowotworowej a także zbadanie ich potencjału antyoksydacyjnego. Zaplanował ponadto oznaczenie w tych grzybach zawartości pierwiastków toksycznych takich jak: Hg, Cd, Pb i As. Cel badań postawiony sobie przez doktoranta uważam za bardzo ambitny ale przede wszystkim za nowatorski, ponieważ w piśmiennictwie brak jest doniesień na temat działania przeciwnowotworowego w stosunku do komórek glejaka wielopostaciowego wybranych ww. gatunków grzybów. Tym też cel swoich badań doktorant uzasadnił oraz wyraził nadzieję, że aktywność przeciwnowotworowa ekstraktów z badanych grzybów będzie istotna i będą one mogły być wykorzystane we wspomaganiu leczenia tego guza mózgu. W rozdziale **Realizacja celów naukowych, materiały i metody badawcze** doktorant opisał jak badane grzyby zostały pozyskane i jak przygotowano z nich ekstrakty, podał metodykę oznaczania zawartości pierwiastków toksycznych, zawartości związków fenolowych, aktywności antyoksydacyjnej oraz jak oceniano cytotoksyczność ekstraktów, ich wpływ na biosyntezę DNA, aktywność metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9, cykl komórkowy komórek glejaka wielopostaciowego i astrogleju ludzkiego, a także zastosowane metody statystyczne. W rozdziale **Podsumowanie wyników i dyskusja** doktorant krótko podsumował i przedyskutował wyniki swoich badań, które zostały szczegółowo omówione w pracach oryginalnych P.3 i P.4. **Wnioski** sformułowane przez doktoranta są prawidłowe i dotyczą głównie badań przedstawionych w P.3 i P.4. Rozdział **Spis piśmiennictwa** obejmuje 76 pozycji osobno wydzielonych na potrzeby komentarza, oprócz 1 pozycji to prace anglojęzyczne. Rozdział **Graficzne streszczenie pracy** jest interesującym pomysłem, ponieważ na jednej stronie doktorant przedstawił krok po kroku przebieg swoich badań oraz wnioski, które wcześniej przedstawił w punktach. Prace wchodzące w skład rozprawy to:

P.1 Nowakowski P., Naliwajko S., Markiewicz-Żukowska R., Borawska M., Socha K. The two faces of *Coprinus comatus* - functional properties and potential hazards. *Phytotherapy Research*, 2020, 34, 2932–2944.

P.2 Nowakowski P., Markiewicz-Żukowska R., Bielecka J., Mielcarek K., Grabia M., Socha K. Treasures from the forest: evaluation of mushroom extracts as anti-cancer agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 143, 112106.

P.3 Nowakowski P., Markiewicz-Żukowska R., Soroczyńska J., Puścion-Jakubik A., Mielcarek K., Borawska M., Socha K. Evaluation of toxic element content and health risk assessment of edible wild mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2021, 96, 103698.

P.4 Nowakowski P., Markiewicz-Żukowska R., Gromkowska-Kępka K., Naliwajko S., Moskwa J., Bielecka J., Grabia M., Borawska M., Socha K. Mushrooms as potential therapeutic agents in the treatment of cancer: Evaluation of anti-glioma effects of *Coprinus comatus*, *Cantharellus cibarius*, *Lycoperdon perlatum* and *Lactarius deliciosus* extracts. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 133, 111090.

Prace te zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach o wysokim IF, który łącznie wynosi 23,492 a ilość punktów MNiSW – 400. Publikacje P.1 i P.2 to prace przeglądowe, P.3 i P.4 – oryginalne. Wszystkie prace są wieloautorskie ale doktorant jest ich pierwszym autorem a dołączone oświadczenia wskazują na jego wiodącą rolę w ich powstaniu (70% jego udział w P.1 i P.2 oraz 60% w P.3 i P.4). Prace zostały opublikowane w krótkim czasie 2 lat (3 w 2020r. i 1 w 2021), co świadczy o pracowitości doktoranta i jego dużym zaangażowaniu w pracę naukową, a udział zespołu Zakładu Bromatologii w ich powstaniu, o jego umiejętności współpracy. Wszystkie ww. prace zostały już ocenione przez recenzentów powołanych przez redakcje czasopism, w których zostały opublikowane, zatem uważam, że ich wartość merytoryczna została potwierdzona. Nie mniej jednak z obowiązku recenzenta powołanego przez Senat UM w Białymstoku, chciałabym się także odnieść do ich treści.

P.1 to praca przeglądowa dotycząca grzyba *Coprinus comatus* (CC), w której doktorant na podstawie 108 pozycji piśmiennictwa, z których 50% stanowiły prace z ostatnich 10 lat, omówił jego skład chemiczny, wartość odżywczą, potencjalny pozytywny wpływ na zdrowie i jego mechanizmy w oparciu o wyniki badań przeprowadzonych na zwierzętach i liniach komórkowych z użyciem ekstraktów, niepożądane skutki jego spożycia i możliwe zanieczyszczenie pierwiastkami toksycznymi. Jest to grzyb konsumowany w dużych ilościach w Chinach ale niejadalny w Polsce i dotychczas nie badany pod kątem jego działania przeciwnowotworowego w stosunku do glejaka. Praca ta jest, jak podkreśla doktorant, pierwszą w tak szerokim zakresie opisującą grzyba CC, który może być rozważany do stosowania jako nutraceutyk, żywność funkcjonalna lub surowiec do preparatów leczniczych. Uważam, że praca jest interesująca, wartościowa, ponieważ pozwala poznać naukowcom i nie tylko, jak to w tytule dobrze ujęto – „dwie twarze” grzyba CC.

Praca P.2 to, jak pisze doktorant, pierwsza tak kompleksowa meta-analiza badań z ostatnich 40 lat dostępnych w bazach danych PubMed i Scopus, dotyczących działania przeciwnowotworowego ekstraktów z różnych grzybów. Na podstawie przeglądu 210 pozycji piśmiennictwa w pracy przedstawiono efekty działania przeciwnowotworowego ekstraktów z grzybów podsumowując w

tabeli 1, w sposób bardzo przystępny, jaki rodzaj raka był badany (38 różnych), jaki gatunek grzybów (92 różne), jaki rozpuszczalnik był zastosowany do przygotowania ekstraktów (12 różnych), jaki był model eksperymentalny - in vitro (linie komórkowe), in vivo (myszy, szczury, case study, randomizowane badania), in silico oraz jaki był mechanizm działania przeciwnowotworowego badanych ekstraktów. Bardzo ciekawym aspektem poruszonym w tej pracy było przedstawienie (tabela 2) wyników bardzo nielicznych badań in vitro i in vivo (9 pozycji piśmiennictwa) dotyczących synergistycznego działania ekstraktów z grzybów z lekami przeciwnowotworowymi, co byłoby bardzo korzystne dla pacjentów. W dyskusji wykorzystano dodatkowo 34 pozycje piśmiennictwa. We wnioskach podkreślono, że publikacja ta może być kompendium wiedzy dla naukowców, lekarzy i firm oraz podstawą do dalszych badań nad grzybami jako nutraceutykami lub składnikami suplementów diety wspierających terapię nowotworów. Całkowicie popieram ten wniosek i uważam, że również ta praca jest bardzo wartościowa i na pewno będzie szeroko cytowana. Praca została opublikowana bardzo szybko co wskazuje, że była bardzo dobrze przygotowana przez autorów na czele z doktorantem, a przegląd tak bogatego piśmiennictwa – na ogromne zaangażowanie zespołu.

P.3 to praca doświadczalna, w której doktorant podjął się oznaczenia zawartości toksycznych pierwiastków: Hg, Pb, Cd, As w kapeluszach i trzonach 7 gatunków dzikorosnących grzybów jadalnych, chociaż dwa z nich w Polsce są niejadalne tj. *Coprinus comatus* i *Lycoperdon perlatum*. Łącznie zbadano 48 prób grzybów stosując nowoczesne metody analityczne (AAS, ETAAS, ICP-MS) z odpowiednią ich walidacją i kontrolą dokładności. Oznaczone zawartości badanych pierwiastków poddano analizie PCA oraz statystycznej ocenie obliczając korelację między ilościami metali w zależności od części grzyba (kapelusz, trzon), jego gatunku oraz rodzaju próbki (sucha masa, świeża masa). Ponadto doktorant przeprowadził ocenę bezpieczeństwa spożycia badanych grzybów stosując do obliczeń odpowiednich wskaźników oznaczone w nich zawartości ww. pierwiastków. Obliczył takie wskaźnik jak PTWI dla Hg, PTMI dla Cd, BMDL dla As i Pb oraz dla wszystkich pierwiastków EDI, THQ, CR i HI. Nie bardzo jest zrozumiałe dlaczego w obliczeniach EDI czy THQ jako FIR (średnie dzienne spożycie grzybów) przyjęto dane z Czech, tj. 10 kg grzybów/rok/osobę? Jest to bardzo duża ilość grzybów i nierealna raczej do spożycia przez przeciętnego konsumenta. Zresztą cytowany autor w tej samej pracy podaje, że spożycie świeżych grzybów w Czechach wynosi rocznie 7 kg/gospodarstwo domowe!, a w innych publikacjach (Food Chem., 2009, 2010), że 5,6 kg/gospodarstwo domowe a nie na osobę. Wg Wojciechowskiej-Mazurek, którą doktorant też cytuje, dane GEMS/Food podają, że średnie spożycie grzybów w krajach UE wynosi 1,5 kg/osobę/rok. Podobne ilości notuje się w USA (Feeney, Nutr. Today, 2014,49). W obliczeniach przyjęto także jako standardową porcję spożywanych świeżych grzybów w Polsce 100 g – ale w jakim czasie? Znowu doktorant powołuje się na publikację Wojciechowskiej-Mazurek, ale w niej wyraźnie pisze, że „zgodnie z danymi EFSA maksymalne spożycie grzybów przez dłuższy okres czasu może dojść do 100 g tygodniowo (14,3 g dziennie); wyższe spożycie może mieć miejsce jedynie sporadycznie”, a spożycie np. 100 g grzybów dziennie może zdarzyć się w grupie populacji o okresowo wysokim

spożyciu. Proszę doktoranta o wyjaśnienie tej kwestii. Wyniki uzyskane w tej pracy doktorant przedstawił bardzo szczegółowo ale w sposób czytelny w 6 tabelach i 2 rycinach oraz przeprowadził dyskusję z wynikami innych autorów. Jednym z wniosków sformułowanych w tej pracy na podstawie uzyskanych wyników, jest to, że badane grzyby kumulowały pierwiastki toksyczne w różnych ilościach w zależności od gatunku ale wskaźnik ryzyka zdrowotnego był niski. Zatem ich spożywanie jest bezpieczne, zwłaszcza, że grzyby są konsumowane w Polsce generalnie nieregularnie, w niezbyt dużych ilościach, a ponadto przetwarzanie (gotowanie, marynowanie, suszenie) zmniejsza znacząco zawartość w nich toksycznych pierwiastków. Należy podkreślić, że omawiana publikacja ze względu na bardzo szeroki zakres założonego celu, który został w pełni zrealizowany, wymagała ogromnego nakładu pracy i zaangażowania doktoranta (i zespołu), zarówno w przeprowadzenie oznaczeń jak i w opracowanie wyników oraz przygotowanie publikacji, w której wykorzystano 84 pozycje piśmiennictwa, w zdecydowanej większości z ostatnich 10 lat.

P.4 to praca oryginalna i uważam, że najważniejsza z cyklu, ponieważ doktorant przedstawił w niej wyniki swoich badań, które miały na celu ocenę aktywności przeciwnowotworowej ekstraktów z 4 wybranych gatunków grzybów względem komórek glejaka wielopostaciowego. Praca była bardzo dobrze przemyślana, założenia i cel pracy dobrze sformułowane a zaplanowany zakres badań wykonany w pełni. We wstępie pracy doktorant podkreślił trudności w leczeniu i nieuleczalność tego nowotworu oraz wskazał na szeroki zakres aktywności biologicznej, w tym na potencjał przeciwnowotworowy badanych grzybów, ale w stosunku do innych raków. Do badań wybrano właśnie te gatunki, które dotychczas nie były opisywane w piśmiennictwie naukowym w aspekcie ich działania hamującego rozwój glejaka a więc jest to praca nowatorska. Badane gatunki grzybów to: *Coprinus comatus*, *Cantharellus cibarius*, *Lycoperdon perlatum* i *Lactarius deliciosus*, z których 2 (kurka i rydz) to grzyby jadalne i często zbierane w Polsce. Ekstrakty z nich wykonano z użyciem wody oraz 70% i 95% etanolu, a ich aktywność przeciwnowotworową badano na komórkach glejaka linii U87MG i LN-18 oraz na komórkach astrogleju ludzkiego SVGp12 oceniając cytotoksyczność ekstraktów, ich wpływ na syntezę DNA, aktywność metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 oraz przebieg cyklu komórkowego, stosując odpowiednie metody. Ponadto w ekstraktach oznaczono całkowitą zawartość związków fenolowych oraz zbadano ich aktywność antyoksydacyjną wykorzystując powszechnie stosowane metody - z odczynnikami Folin-Ciocalteu oraz DPPH. Cała procedura badań została dobrze opisana w rozdziale Materiały i metody. Zabrakło natomiast wyjaśnień skrótów, których użyto potem w legendzie do rycin 1-4 i 7, a mianowicie co oznaczają litery C, K, R czy P bo co oznacza W, E70 czy E75 to wiadomo. Wyniki opracowano statystycznie, przedstawiono w 1 tabeli i bardzo szczegółowo na 10 rycinach oraz przedyskutowano wykorzystując odpowiednie piśmiennictwo. Tu też mała uwaga – w dyskusji na stronie 9 pracy pomieszały się troszkę numery cytowanych 3 prac, tj. przy Zaidman et al. jest [27] a powinno być [21], przy Lemieszek et al. jest [68] a powinno - [55], przy Hou et al. jest [64] a powinno – [56]. Dyskusji jest bardzo ciekawa i wyczerpująca, ponieważ doktorant, wykorzystując wyniki również innych autorów, przedyskutował

możliwe mechanizmy przeciwnowotworowego działania badanych ekstraktów biorąc pod uwagę składniki biologicznie aktywne występujące w grzybach. Na podstawie uzyskanych w pracy wyników doktorant sformułował wnioski, z których jeden stwierdza, że najwyższą zdolnością antyoksydacyjną odznaczały się ekstrakty z *Coprinus comatus* i *Lycoperdon perlatum*, i że może to być związane z dużo większą zawartością związków fenolowych w tych 2 grzybach niż w pozostałych. W innym stwierdza, że etanolowe ekstrakty wykazały silniejsze działanie cytotoksyczne niż wodne. Ale najważniejszym wnioskiem wynikającym z badań doktoranta jest ten, w którym stwierdza on, że badane ekstrakty z wszystkich grzybów wykazały działanie przeciwnowotworowe względem komórek glejaka (najsilniejsze z *Lactarius deliciosus* i *Coprinus comatus*), i że wykazano to po raz pierwszy. Sugeruje też, że uzyskane wyniki mogą być to przesłanką do dalszych badań ale już in vivo na modelu zwierzęcym.

Należy ponadto zauważyć, że oprócz cyklu składającego się na pracę doktorską doktorant posiada w swoim dorobku jeszcze 20 innych prac co daje łączny IF = 92,034 i 2089 pkt MNiSW (w tym 5 prac opublikowanych w 2020, 7 w 2021 i 1 w 2022) oraz 45 doniesień na konferencjach krajowych i zagranicznych. Jest to imponujący dorobek jak na tak młodego naukowca i świadczy o jego dużym potencjale. Należy także podkreślić, że od początku pracuje w bardzo dobrze zorganizowanym zespole naukowym Zakładu Bromatologii UM w Białymstoku, którego stworzenie to ogromna zasługa Pani Prof. Marii Borawskiej, byłego kierownika tego Zakładu. Te dobre tradycje są nadal kontynuowane przez obecnego kierownika dr hab. Katarzynę Sochę i pozostałych pracowników.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Patryka Nowakowskiego jest bardzo dobrze zaplanowaną i zrealizowaną pracą naukową z zakresu nauk farmaceutycznych, w tym bromatologii. Uważam, że wyniki jego badań są bardzo wartościowe, poszerzają dotychczasową wiedzę o potencjale prozdrowotnym grzybów. Mają nie tylko znaczenie poznawcze ale także praktyczne. Praca spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim, zawarte w ustawie O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z dnia 14.03.2003r. z późniejszymi zmianami).

W świetle powyższego składam wniosek do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o przyjęcie pracy i dopuszczenie **mgr Patryka Nowakowskiego** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
BROMATOLOGII I DIETETYKI
kierownik
prof. dr hab. Halina Grajeda