

Warszawa 28.07.2023r

Prof. dr hab. Joanna S. Kruszewska
Pracownia Biologii Grzybów
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Aleksandra Roszczyka pt. „ Wpływ wzbogaconego selenem polisacharydu (Se-Le-30) izolowanego z grzybni *Lentinula edodes* na limfocyty T.” wykonanej pod kierunkiem dr hab. n. med. Beaty Kalety jako promotorki i dr n. wet. Katarzyny Zielniok jako promotorki pomocniczej.

Pan mgr Aleksander Roszczyk jest autorem 9 prac opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o IF sumarycznym IF 46,326 i 1030 punktach ministerialnych. Z opublikowanych prac pan mgr wybrał 3 prace które weszły w skład cyklu zaprezentowanego w rozprawie doktorskiej. Każda z tych 3 prac ma IF powyżej 6. Pan mgr Roszczyk jest pierwszym autorem dwóch prac i pierwszym równorzędnym autorem pozostałej pracy.

Ocena pracy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska pana mgr Aleksandra Roszczyka zawiera streszczenie, założenia i cel pracy, kopie trzech prac wchodzących w skład rozprawy i materiały uzupełniające gdzie znajduje się opis materiałów i metod oraz wyników doświadczeń nie zamieszczonych w publikacjach. Rozprawę kończy podsumowanie i wnioski oraz spis literatury.

Celem pracy było określenie czy wzbogacony w selen polisacharyd (Se-Le-30) izolowany z grzybni *Lentinula edodes* posiada właściwości immunomodulacyjne w stosunku do ludzkich limfocytów T i poznanie mechanizmów takich zmian. Cel pracy jest sformułowany niefortunnie. Celem pracy nie może być dokonanie przeglądu literatury a przegląd literatury jest narzędziem do uzyskania jakiegoś celu. Podobnie samo zbadanie czegoś nie jest celem ale badania dokonuje się aby osiągnąć cel.

W rozdziale cel pracy Doktorant wymienił jakie doświadczenia zamierza zrobić i w jaki sposób aby określić jaki jest wpływ polisacharydu Se-Le-30 na wybrane elementy układu immunologicznego.

Krótki wstęp przedstawia najważniejsze aspekty pracy. Doktorant przytacza prace które prezentują obecność najróżniejszych związków w grzybni *L. edodes*, które wpływają na układ immunologiczny, mają właściwości przeciwnowotworowe, antyoksydacyjne i przeciwbakteryjne.

Wyniki

Publikacja nr 1 jest publikacją przeglądową

Pierwsze prace dotyczące aktywności biologicznej polisacharydów *L. edodes* pochodzą sprzed 50 lat. Stwierdzano podnoszenie efektywności układu immunologicznego u pacjentów z chorobami nowotworowymi. Lentinan podawano dożylnie z klasyczną chemioterapią. Prowadzono też badania podając Lentinan doustnie i stwierdzono zmiany w mikrobiomie jelitowym ale nie było zmian immunomodulacyjnych. Stwierdzono, natomiast, że regularne spożywanie *L. edodes* wpływa na poprawę odporności, jednak nie analizowano, który składnik grzyba wywierał działanie immunomodulujące.

Doktorant zwraca uwagę na niezwykle bogactwo różnych związków aktywnych biologicznie u *L. edodes* w tym polisacharydów. Dalej wskazuje na istnienie wielu receptorów powierzchniowych na takich komórkach jak monocyty, makrofagi, neutrofile, komórki NK, komórki dendryczne oraz limfocyty T i B. Receptory te rozpoznają glukany. Glukany są obecne w ścianach komórkowych mikroorganizmów i z tego powodu są rozpoznawane przez nasz system immunologiczny.

Ze względu na fakt, że polisacharydy grzybowe z różnych źródeł mają różny skład, masę cząsteczkową i konformację, mogą wiązać się z wieloma typami receptorów z różnym powinowactwem i aktywować różne szlaki sygnałowe. Ważne jest czy polisacharydy pochodzą z grzybni czy owocnika, jaką metodą były izolowane, jaki mają skład chemiczny, czy łańcuchy polisacharydowe są rozgałęzione i jak bardzo. Lentinan jest 1,3- β -glukanem z rozgałęzieniami 1,6, otrzymanym z owocników *L. edodes* i ma właściwości immunostymulatora. Inne polisacharydy z tego grzyba wykazywały działanie immunosupresyjne.

Wiele grup badawczych izolowało różne frakcje polisacharydowe z *L. edodes* i pokazywało ich działanie na układ immunologiczny czy mikrobiom jelit. W zależności od wyizolowanej frakcji stosowanych dodatków czy też sposobu podawania stwierdzano różne efekty immunomodulacyjne. Obserwowano pobudzanie układu immunologicznego, zmniejszanie guzów nowotworowych albo zmiany w mikrobiomie jelitowych i hamowanie reakcji zapalnych.

Publikacja jest doskonałym wstępem do rozprawy podsumowując stan wiedzy na temat immunomodulacyjnych właściwości różnych polisacharydów z *L. edodes*.

Publikacja nr 2

Dotyczy wpływu polisacharydu związanego z selenem, wyizolowanego z *L. edodes* na komórki układu immunologicznego. Doktorant oparł się na doniesieniach z których wynika, że frakcje polisacharydowe wpływają na układ immunologiczny ale różne frakcje mogą dawać skrajnie różne efekty. Dlatego też trzeba zdefiniować te frakcje i przypisać im konkretne działanie gdyż efekty immunostymulacji lub immunosupresji a także efekty przeciwnowotworowe obserwowane po ich podaniu to jedne z najbardziej poszukiwanych w dobie licznych zachorowań na choroby nowotworowe i immunologiczne.

Zespół prof. Turło opublikował wcześniejsze badania pokazujące, że *L. edodes* akumuluje selen z pożywki, następnie, że selen jest włączany do frakcji polisacharydowych (Malinowska i inni 2018). Działanie immunosupresyjne tych frakcji a także doniesienia o wpływie spożywania grzyba *L. edodes* na poprawę odporności, skłoniło badaczy do dokładnej analizy struktury glukanów i ich wiązania z selenem. Celem publikacji 2 było określenie jaki wpływ na ludzkie komórki układu odpornościowego in vitro ma konkretna frakcja Se-Le-30. Wcześniej opracowano metodę izolacji i określono strukturę tej frakcji (Klimaszewska i inni, 2021). Mgr Roszczyk przypomniał pokrótce co zawierała badana frakcja. Dominował α -1,4- glukan o strukturze helikalnej a następnie β -1,3- i β -1,6 glukan o strukturze nierozgałęzionej oraz β -1,6 glukan rozgałęziony. Zawartość selenu wynosiła 48 μ g/g. W badaniach Doktorant użył uznanej metody oceny wpływu różnych czynników na proliferację stymulowanych mitogenem jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMCs). PBMCs były stymulowane przeciwciałami anti-CD3, fitohemaglutyniną (PHA) oraz zawiesiną *Staphylococcus aureus*. Efekt działania Se-Le-30 okazał się różny i zależny od stymulatora.

Dlaczego Doktorant wybrał te konkretne mitogeny?

Następnie Doktorant ocenił wpływ Se-Le-30 na PBMCs stymulowane alloantygenem stosując test reakcji mieszanych limfocytów. Test pokazuje aktywację i proliferację limfocytów T i jest stosowany w testowaniu zgodności tkankowej podczas przeszczepów. Frakcja Se-Le-30 hamowała proliferację PBMCs stymulowanych alloantygenem.

Badano także wpływ Se-Le-30 na cytotoksyczność komórek NK. Jako komórki docelowe dla NK wykorzystano linię komórkową ludzkiej przewlekłej białaczki. Stwierdzono obniżenie cytotoksyczności komórek NK.

Kolejny etap to badanie wpływu Se-Le-30 na limfocyty T CD3+ produkujące cytokiny. Doktorant stwierdził, że wybiórczo spada liczba limfocytów T CD3+ produkujących TNF- α (czynnik martwicy nowotworu). Liczba limfocytów T CD3+ produkujących interleukinę IL-10, interferon IFN γ i transformujący czynnik wzrostu TGF- β nie uległa zmianie.

SE-LE-30 nie miał także wpływu na produkcję nadtlenków przez granulocyty. W Dyskusji Doktorant porównuje działanie frakcji Se-Le-30 i lentinanu. Z Dyskusji wynika, że frakcja Se-Le-30 ma zdecydowanie bardziej wybiórcze, węższe działanie

w porównaniu z lentinanem. Różnice w działaniu Doktorant przypisuje składowi i strukturze obu frakcji.

Ciekawe wydaje się, że frakcja Se-Le-30, bardziej złożona niż frakcja zwana lentinanem mimo to jest bardziej selektywna.

Publikacja nr 3

Doktorant kontynuował charakteryzowanie wpływu Se-Le-30 na układ immunologiczny. Tym razem badał bezpośrednio limfocyty T i syntezę cytokin. Limfocyty T aktywował przeciwciałami jednym lub dwoma.

Se-Le-30 hamował proliferację komórek CD4⁺ T i CD8⁺ T stymulowanych przeciwciałem anti-CD3 a wzmacniał proliferację CD4⁺ T i nie zmieniał proliferacji CD8⁺ T przy podwójnej stymulacji przeciwciałami anti-CD3/CD28. Wpływ Se-Le-30 na pojawianie się markerów powierzchniowych CD69 i CD25 aktywacji komórek CD4⁺ T i CD8⁺ T również zależał od aktywacji pojedynczym lub dwoma przeciwciałami. Polisacharyd obniżał procent komórek CD4⁺CD69⁺ (wczesny marker) po stymulacji jednym przeciwciałem i podwyższał procent komórek CD4⁺CD69⁺ stymulowanych przeciwciałami anti-CD3/CD28. Podobnie było z markerem CD25 pojawiającym się później gdzie również stymulacja dwoma przeciwciałami dawała wyraźne różnice wpływu Se-Le-30.

Se-Le-30 miał znaczący wpływ na produkcję cytokin. Stymulacja przeciwciałami CD3/CD28 znacząco podniosła ilość interferonu INF γ i interleukiny IL-6 i IL-10 po dodaniu polisacharydu. W zasadzie ilość IL-5 i IL-10 wydzielonych przez PBMCs był podobny niezależnie od stymulacji przeciwciałami czy bez stymulacji. Polisacharyd nie zmienił ilości IL-2 i IL-4. Poziom IL-2 i IL-4 został obniżony po dodaniu polisacharydu przy stymulacji anti-CD3.

Doktorant podejrzewa, że receptor CR3 może być blokowany przez Se-Le-30 co hamuje proliferację limfocytów T stymulowanych tylko przeciwciałem anti-CD3.

Dlaczego Doktorant użył mieszaniny przeciwciał CD3/CD28 do stymulacji limfocytów? Czy wiadomo jak działa samo przeciwciało CD28? Czy nie zachodzi prawdopodobieństwo, że jedno przeciwciało hamuje a drugie stymuluje proliferację co ogranicza pożądany efekt stymulacyjny?

W Dyskusji Doktorant porównuje uzyskane efekty frakcji Se-Le-30 na elementy układu immunologicznego z badaniami wykonanymi dla innych frakcji takich jak lentinan czy frakcja AHCC[®]. Niektóre efekty się pokrywają jak np. zwiększanie sekrecji interferonu IFN γ przez komórki CD4⁺ i CD8⁺. Doktorant zwraca też uwagę na praktyczne zastosowanie glukanu AHCC[®] jako wzmacniacza proliferacji komórek CD8⁺ w szczepionce na grype.

Inne badania pokazały np. że glukany z *L. edodes* nie wpływały na sekrecję cytokin. Trudno jednak do końca porównać te badania ze względu na różne drogi podawania glukanów ochotnikom. Badania wykonane in vitro również wymagają dalszych uzupełnień w badaniach in vivo.

Z badań wynika wniosek, że skład frakcji, budowa glukanów oraz sposób podania ma znaczenie i wymaga dalszych badań. Jedno jest pewne, komórki układu immunologicznego posiadają wiele receptorów rozpoznających polisacharydy i z tego powodu polisacharydy powodują różną odpowiedź ze strony tego układu. Ta odpowiedź może przechodzić przez różne ścieżki sygnałowe dlatego też wyniki otrzymane przez Doktoranta generują następne pytania szczególnie o konkretne mechanizmy działania Se-Le-30.

Wyniki uzupełniające

Doktorant zadał sobie pytanie czy Se-Le-30 działa tylko na limfocyty T czy też na inne komórki układu immunologicznego.

Rycina 2 i 3 przedstawiają odpowiednio wpływ Se-Le-30 na ekspresję markera CD366 i CD279. Niezależnie od tego czy badano wyizolowane limfocyty T czy całą frakcję PBMCs uzyskano podobny profil działania Se-Le-30 na pojawianie się markerów powierzchniowych (CD25, CD366 i CD279) i produkcję interferonu IFN- γ , czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- α) i interleukiny IL6. Efekt był jednak wyraźniejszy dla PBMCs co pozwoliło Doktorantowi zasugerować, że nie tylko limfocyty T ulegają wpływowi polisacharydu.

Doktorant pokazał także wpływ polisacharydu na aktywację szlaku sygnałowego TCR badając poziom fosforylacji białek tego szlaku i stwierdził hamowanie fosforylacji w stymulowanych limfocytach T pod wpływem polisacharydu.

Wnioski

Doktorant w punktach podsumowuje wszystkie wyniki. Podsumowanie jest jasne i zawiera najważniejsze wnioski z badań.

Pytania do Doktoranta są podkreślone w tekście. Poniżej umieściłam pytania o plany dalszych badań.

W jakim kierunku powinny zdyżać kolejne prace? Czy izolacja innych frakcji czy inne grzyby? Wydaje się, że można stworzyć wysoko selektywne frakcje.

Czy stwierdzone działanie Se-Le-30 na elementy układu immunologicznego pozwala wnioskować, że ta frakcja polisacharydów może mieć korzystne działanie na ludzki organizm i w jakich przypadkach?

Ocena końcowa

Stwierdzam, że praca zawiera ogrom wyników dotyczących wpływu frakcji polisacharydowej wzbogaconej selenem Se-Le-30 na różne elementy układu immunologicznego. Praca przeglądowa stanowi dobre wprowadzenie do badań przedstawionych w dalszej części rozprawy. Wybrane do rozprawy publikacje stanowią spójną całość.

Po przedstawieniu wyników i wyników dodatkowych Doktorant prawidłowo podsumowuje i wyciąga wnioski. Ostrożnie proponuje ogólny mechanizm działania Se-Le-30. Pewne różnice wpływu Se-Le-30 obserwowane w hodowli izolowanych

limfocytów T i w PBMCs sugerują, że polisacharyd może działać bezpośrednio na limfocyty T ale także pośrednio poprzez wpływ na populację monocytów i/lub makrofagów mogących dalej oddziaływać na limfocyty T. Badania dodatkowo mają aspekt wdrożeniowy co w mojej ocenie stanowi dodatkowy atut tej pracy.

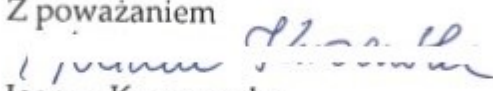
Promotorka rozprawy pani dr hab. nauk med. Beata Kaleta jest współtwórcą zgłoszenie patentowego P.438570 dotyczącego kompozycji farmaceutycznej zawierającej polisacharyd wzbogacony selenem a badania tego polisacharydu wykonane przez Doktoranta są wyraźnie prowadzone pod kątem medycznym. Dodatkowo jestem pod wrażeniem dużego dorobku publikacyjnego Doktoranta. Poza trzema publikacjami włączonymi do rozprawy Doktorant jest współautorem jeszcze sześciu innych publikacji. W sumie IF wszystkich publikacji to 46,326 i 1030 punktów MEiN.

Wniosek końcowy

Uważam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia warunki określone w ustawie z dn. 20 lipca 2018 roku o stopniach i tytule naukowym (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2023 r. poz. 742). Cel pracy został osiągnięty, wyniki są oryginalne a praca ma niepodważalny walor poznawczy. Dlatego wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie pana mgr. Aleksandra Roszczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na pokaźny całkowity dorobek naukowy Doktoranta i wysoki IF prac przedstawionych w rozprawie (IF trzech prac z rozprawy to 18,336), szerokie ujęcie tematu, zwięzłe, jasne przedstawienie wyników, nie budzące wątpliwości podsumowanie i wnioski stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie pracy doktorskiej pana mgr Aleksandra Roszczyka.

Z poważaniem


Joanna Kruszewska