

Warszawa, 7 listopada 2023 r.

Dr hab. inż. Piotr Bąska, Profesor SGGW

Zakład Farmakologii i Toksykologii, Katedra Nauk Przedklinicznych

Instytut Medycyny Weterynaryjnej, SGGW w Warszawie

ul. Ciszewskiego 8, budynek 23, pokój 2105

02-786 Warszawa

tel. 22 59 360 22

email: piotr_baska@sggw.edu.pl

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
INSTYTUT MEDYCYN WETERYNARYJNEJ
KATEDRA NAUK PRZEDKLINICZNYCH
ZAKŁAD FARMAKOLOGII I TOKSYKOLOGII

Recenzja Dysertacji Doktorskiej

Przedłożona do recenzji Rozprawa Doktorska Pani mgr inż. **Malwiny Katarzyny Mularczyk** pt. **„Astaksantyna i postbiotyki – dwa obiecujące czynniki zwiększające wrażliwość na insulinę w zespole metabolicznym u koni”** składa się ze 126 stron i zawiera 102 prace zawarte w bibliografii. Praca wykonana została na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu pod kierunkiem Prof. dr hab. Krzysztofa Marycza oraz Prof. dr Michaela Röckena. Badania prowadzone były w ramach projektu pn. „UPWR 2.0: międzynarodowy i interdyscyplinarny program rozwoju Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu”, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Działania 3.5. - Kompleksowe programy szkół wyższych Osi III Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój oraz budżetu państwa na podstawie umowy o dofinansowanie nr POWR.03.05.00-00-Z062/18 z dnia 4 czerwca 2019 r.

W skład Rozprawy wchodzi cztery prace: dwie eksperymentalne i dwie przeglądowe. Łączny współczynnik wpływu (IF) prac to 17,862, co jest bardzo dobrym rezultatem. O jakości pracy nie świadczą jednak jedynie uzyskane punkty, ale w równym stopniu treść oraz wkład w rozwój nauki, a ten również nie pozostawia wiele do życzenia. Przedstawienie wyników i syntetyczne omówienie danych literaturowych w pracach przeglądowych jak i samej Rozprawie również są na wysokim poziomie.

Struktura Pracy i jej ocena

Rozprawa rozpoczyna się wykazem skrótów (str. 6 - 8), za którym znajduje się dwudziestostronicowy wstęp (str. 10 – 29). W kolejnej części znajdują się publikacje wchodzące w skład rozprawy:

1. Artykuł przeglądowy (str. 32 - 53):

Mularczyk M, Michalak I, Marycz K. Astaxanthin and other Nutrients from *Haematococcus pluvialis*-Multifunctional Applications Mar Drugs. 2020 Sep 7;18(9):459. doi: 10.3390/md18090459. IF = 4,379.

2. Artykuł eksperymentalny (str. 54 – 76):

Mularczyk M, Bourebaba N, Marycz K, Bourebaba L. Astaxanthin Carotenoid Modulates Oxidative Stress in Adipose-Derived Stromal Cells Isolated from Equine Metabolic Syndrome Affected Horses by Targeting Mitochondrial Biogenesis. Biomolecules. 2022 Jul 27;12(8):1039. doi: 10.3390/biom12081039. IF = 6,064.

3. Artykuł przeglądowy (str. 78 - 92):

Bourebaba Y, Marycz K, Mularczyk M, Bourebaba L. Postbiotics as potential new therapeutic agents for metabolic disorders management. Biomed Pharmacother. 2022 Sep;153:113138. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113138. IF = 7,419.

4. Artykuł eksperymentalny (str. 93 – 110):

Mularczyk M, Bourebaba Y, Kowalczyk A, Marycz K, Bourebaba L. Probiotics-rich emulsion improves insulin signalling in Palmitate/Oleate-challenged human hepatocarcinoma cells through the modulation of Fetuin-A/TLR4-JNK-NF-κB pathway. Biomed Pharmacother. 2021 Jul;139:111560. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111560. IF = 4,545.

We wszystkich ww. pracach Doktorantka ma znaczący wkład opisany szczegółowo w oświadczeniach przedstawionych na czterech ostatnich stronach Rozprawy.

Strona 111 rozpoczyna dyskusję, która kończy się na stronie 113. W rozdziale piątym (str. 114 -115) przedstawione jest syntetyczne podsumowanie całej Rozprawy z naciskiem na wyniki oraz wnioski. Bibliografia zajmuje strony 116 – 126 oraz zawiera 102 pozycje bibliograficzne. Ostatnie cztery (nieponumerowane) strony zawierają opatrzone podpisem elektronicznym oświadczenia Doktorantki o osobistym wkładzie w każdą z ww. prac.

Struktura pracy jest poprawna. Wykaz skrótów ułatwia zapoznanie się z pracą. Streszczenie jest zwarte i zawiera niezbędne informacje dotyczące rozprawy. Streszczenie przedstawione jest w języku polskim oraz angielskim. We wstępie Doktorantka opisała syndrom metaboliczny koni (EMS), jego przyczyny i objawy, a także mechanizmy molekularne wchodzące w jego skład (lub będące przyczyną) – stres oksydacyjny, insulinooporność, cytokiny prozapalne, adipokiny, a także samą tkankę tłuszczową. Autorka wskazała również fakt, że kluczowym elementem zapobiegania

syndromowi metabolicznemu jest aktywność ruchowa oraz odpowiednio zbilansowana dieta, co z resztą nie jest niczym odkrywczym jednak warto położyć nacisk na propagowanie tego truizmu. Niedopatrzeniem jest zacytowanie pracy nr z bibliografii. Autorka napisała: „*Badania przeprowadzone przez Durhama potwierdziły...*” (str. 16). Badania te są wielo autorskie więc powinno być zapisane „...przez Durhama i wsp. (2019)...”. Forma cytowania ze strony 22 jest bardziej poprawna „...*Nishida i in...*” jednak tutaj również brakuje daty opublikowania pracy. Dodatkowo odnośnie cytowań na stronie 27 w zdaniu „*Dysfunkcja ASC prowadzi do nieprawidłowej przebudowy tkanki tłuszczowej, co wiąże się z większym ryzykiem zaburzeń metabolicznych.*” również należałoby zacytować artykuł, z którego pozyskana została ta informacja. W kolejnej części wstępu znajduje się opis i krótka historia poszukiwania oraz wykorzystania substancji bioaktywnych pozyskiwanych z mikroorganizmów ze szczególnym naciskiem na charakterystykę astaksantyny, która jest obiektem przedstawianych badań. Opis ten bardzo dobrze charakteryzuje działanie substancji. Wątpliwość budzi stwierdzenie: „*Nadmierna suplementacja astaksantyną skutkowała zwiększeniem enzymów antyoksydacyjnych i obniżonym ciśnieniem krwi u szczurów z nadciśnieniem.*” (str. 21). Zjawiska te wydają się być pozytywne, a słowo „nadmierna” sugeruje pejoratywne działanie. Oczekuję ustosunkowania się Doktorantki podczas Obrony. Dodatkowo sformułowanie „...*zwiększeniem enzymów antyoksydacyjnych...*” jest niepoprawne. Enzymy nie zwiększają swoich rozmiarów (co sugeruje zdanie), ale ekspresję lub aktywność. Zakładam, że jest to niedopatrzenie i zbyt daleko idący skrót myślowy jednak również proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się. Dodatkowo na str. 19 użyto sformułowania „...*ilością wolnych rodników...*”. Powinno się tu użyć „...*liczbą wolnych rodników...*”; fakt, że jest ich bardzo dużo nie zmienia tego, że jest to rzeczownik policzalny i „liczbą” jest tutaj właściwym słowem. Dalej znajduje się bardzo dobry opis i klasyfikacja pro- pre- i post- biotyków oraz charakterystyka działania tych ostatnich. Po wstępie merytorycznym ma miejsce przedstawienie celów oraz hipotezy badawczej. Jest to rozdział jasny i czytelny. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka pokusiła się o optymalizację metody pozyskiwania badanej substancji z *Phaffa rhodozyma*, co prawdopodobnie znacznie ułatwi w przyszłości pracę obecnego/ przyszłego zespołu badawczego Doktorantki. Optymalizacja metody to bardzo żmudne i kolokwialnie mówiąc „nudne” zajęcie jednak jest ono niezbędne w badaniach naukowych i podjęcie się tego zadania przemawia również na korzyść Doktorantki. Oczywiście główne cele pracy były inne, ale bez pracochłonnego procesu optymalizacji nie dałoby się ich osiągnąć. Widać, że Autorka bardzo dużo pracy włożyła w przygotowanie rozdziału „Wstęp”. Jest on napisany bardzo dobrze, zawiera niezbędne informacje i wprowadza czytelnika w temat badań, a drobne błędy związane z niewłaściwymi cytowaniami, sformowaniami językowymi nie obniżają jakości merytorycznej i są nieuniknione podczas przygotowywania Rozprawy Doktorskiej.

Ocena Dysertacji pod względem merytorycznym

Symbol metaboliczny to choroba cywilizacyjna XXI wieku, której główne przyczyny to: siedzący tryb życia, niewłaściwa dieta, stres i niska aktywność fizyczna u ludzi. Objawia się otyłością, chorobami sercowo naczyniowymi, zaburzonym metabolizmem glukozy oraz nadmiernym stężeniem wolnych kwasów tłuszczowych we krwi. Najprostszą metodą zapobiegania oraz leczenia jest unikanie czynników prowadzącym do tej choroby czyli zwiększenie aktywności fizycznej oraz odpowiednia dieta. Syndrom metaboliczny jest szeroko opisywanym problemem w medycynie ludzkiej. Doktorantka w swoich badaniach skupiła się na badaniu tego schorzenia w medycynie weterynaryjnej weryfikując hipotezę badawczą o pozytywnym wpływie astaksantyny oraz postbiotyków na metabolizm glukozy.

Praca nr 1 jest pracą przeglądową. Zawiera szczegółowy opis działania astaksantyny i innych substancji pozyskanych z *Haematococcus pluvialis*. Praca składa się z 22 stron i jest znakomitym kompendium wiedzy dotyczącym tematu niniejszej Rozprawy Doktorskiej. W pracy nr 2. Przedstawiono badania dotyczące wpływu astaksantyny na apoptozę, zaburzone działanie mitochondriów oraz stres oksydacyjny w końskich macierzystych komórkach tkanki tłuszczowej (ASC). Komórki te były pozyskane z kolekcji Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Do oceny parametrów charakteryzujących komórki wykorzystano szereg technik opisanych w publikacji w rozdziale materiały i metody w punktach 2.3 – 2.13, co daje bardzo szeroki obraz molekularnych efektów oddziaływania badanej substancji na ASC. Opisy metody są szczegółowe. Wykazano, że astaksantyna poprawia żywotność, stopień proliferacji, redukuje intensywność apoptozy, zmniejsza stres oksydacyjny, zmienia ekspresję genów zaangażowanych w metabolizm mitochondriów i zwiększa różnicę potencjałów ich błony. Wyniki są bardzo ciekawe i niewątpliwie wnoszą dużo wiedzy nt. działania astaksantyny i jej protekcyjnego działania w syndromie metabolicznym w modelu *in vitro*. W publikacji można było wspomnieć więcej nt. badanych komórek ASC. Wprawdzie podano źródło pozyskania komórek jednak proszę Doktorantkę o informację nt. stanu fizjologicznego komórek tj. czy były to komórki pobrane od zdrowego konia czy od konia ze zdiagnozowanym syndromem metabolicznym (taka informacja znajduje się na stronie 111 w rozdziale „Dyskusja”) jak również o informację o liczbie koni, od których komórki pobrano. Niewielkim uchybieniem jest podanie stężenia antybiotyków w podłożu hodowlanym. Z pewnością nie był to 1% roztwór antybiotyków. Proszę Doktorantkę, aby w trakcie obrony ustosunkowała się i podała w sposób prawidłowy stężenie penicyliny i streptomycyny. Pewna część pracy polegała na ocenie zmiany ekspresji badanych genów techniką RT-qtPCR. Wyniki analizowane były metodą $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Metoda ta zakłada, że startery wykorzystywane do reakcji namnażają produkty ze 100 % efektywnością. W większości przypadków taki stan rzeczy rzeczywiście ma miejsce. W przeciwnym jednak razie

trzeba zastosować inny rodzaj obliczeń (rozwinęte w omówieniu publikacji nr 4 w niniejszej Recenzji). W publikacji nie ma informacji nt. oceny efektywności namnażania staterów.

Kolejne dwa artykuły dotyczą pro- i post- biotyków. Praca nr 3 jest pracą przeglądową natomiast praca nr 4 eksperymentalną. Obie prace opublikowane są w renomowanych wysoko punktowanych czasopismach. Zaskoczenie budzi zdanie na stronie 77 gdzie Autorka twierdzi, że praca przeglądowa (nr 3) była podstawą do zaplanowania i przeprowadzenia eksperymentów do pracy badawczej (nr 4). Praca nr 3 opublikowana została w 2022 roku, a praca nr 4 w 2021 roku więc jeśli Doktorantka nie ma zdolności podróży w czasie taki stan rzeczy jest mało prawdopodobny. Zakładam, że Autorka sukcesywnie przygotowywała się do eksperymentów pisząc jednocześnie obie prace, a czas trwania procesu recenzji i analizy wyników sprawił różnicę w terminie ukazania się obu publikacji. Zdanie to jest po prostu niefortunne jednak w żaden sposób nie umniejsza wartości pracy przeglądowej (240 cytowanych pozycji bibliograficznych), która jest (tak jak praca nr 1) bardzo dobrym kompendium wiedzy dotyczącym badanych zagadnień. Podobnie ma się rzecz z eksperymentalną pracą nr 4, gdzie badania zostały bardzo dobrze przemyślane i zaplanowane. Wykorzystano tutaj dwa szczepy bakterii: *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 8010 oraz *Pediococcus acidilactici* NCIBM 8018, do przygotowania emulsji i stymulacji nią linii komórek wątroby HepG2 (poddanych ekspozycji na długołańcuchowe wolne kwasy tłuszczowe). Na podkreślenie zasługuje fakt dokładnej oceny i charakterystyki stabilności badanego preparatu (uzyskanej emulsji), co jak wspomiano, świadczy o przemyślanym podejściu do tematu. Dodatkowo, bardzo istotnym faktem jest dokładny opis przeciwciał wykorzystanych do analizy Western blot. W pracy dokładnie podano przeciwciała z opisem wykrywanego aminokwasu fosforylowanego w konkretnym białku. W literaturze można często spotkać się jedynie z lakonicznym opisem, że wykrywano fosforyzowane białko bez dokładnej charakterystyki. Niewiele to wnosi gdyż fosforylacja aminokwasów może działać zarówno aktywująco jak i hamująco na aktywność biologiczną białka. Startery do reakcji PCR są również szczegółowo opisane. Z opisu wynika, że Autorzy sami je projektowali z wyjątkiem jednego zestawu (oceniającego ekspresję *Mfn1*), gdyż tylko do tego jest odnośnik bibliograficzny. Brakuje opisu jaką metodą była przeprowadzona analiza ekspresji genów w stosunku do genu referencyjnego tj. GAPDH. Czy była to standardowa metoda $2^{-\Delta\Delta Ct}$ czy może Autorzy pokusili się o bardziej zaawansowaną metodą opisaną w pracy: „Michael W. Pfaffl. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1; 29(9): e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45”. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy są bardzo interesujące i mogą mieć w przyszłości przełożenie na projektowanie składu pasz dla koni. Wykazano, że emulsja zawierająca badane probiotyki działa protekcyjnie na niekorzystne efekty wywołane przez wolne kwasy tłuszczowe (FFA) w komórkach wątroby HepG2 tj.: stłuszczenie wątroby, indukcję apoptozy, zaburzone przekazywanie sygnału insuliny. Dyskusja jest przeprowadzona dojrzałe i merytorycznie.

Autorka wykazuje znajomość tematu i bardzo dobrze porównuje uzyskane wyniki z danymi literaturowymi opublikowanymi przez innych naukowców.

Ostatnim rozdziałem jest Dyskusja (str. 111 – 113), która stanowi zwięzłe podsumowanie wyników i nie budzi żadnych wątpliwości, a jedynie stanowi skondensowaną interpretację oraz omówienie uzyskanych wyników.

Uwagi końcowe dotyczące Dysertacji

Doktorantka podjęła się ciekawego oraz bardzo znaczącego, z punktu widzenia żywienia, tematu jakim jest molekularne działanie astaksantyny oraz substancji aktywnych biologicznie na hamowanie objawów strasu metabolicznego. Swoje doświadczenia przeprowadziła w modelach *ex vivo* oraz *in vitro*. Oczywiście lepszym modelem byłoby przeprowadzanie doświadczeń *ex vivo* na hodowlach pierwotnych wątroby koni jednak jest to bardzo problematyczne z punktu dostępności do materiału dlatego wykorzystanie stabilnej linii komórek wątroby jest tu jak najbardziej uprawnione. Oba wykorzystane modele bardzo dobrze nadają się do charakterystyki molekularnych mechanizmów jakich podjęła się Doktorantka. Chciałbym prosić Doktorantkę o odpowiedź na pytanie jak widzi w przyszłości możliwość przeprowadzenia badań na hodowlach pierwotnych komórek wątroby konia. Praca ma wysoki charakter poznawczo badawczy i jest napisana w bardzo dobry sposób. Przejrzysty i czytelny wstęp wprowadza w temat, hipoteza badawcza oraz cele są jasno zdefiniowane i konsekwentnie realizowane. Mankamentem pod względem edytorskim jest zostawianie w całej pracy pojedynczej litery na końcu wiersza, co nie powinno mieć miejsca; jak również zastosowanie kropki zamiast przecinka podając IF (współczynnik wpływu) publikacji. W języku polskim używamy w tym przypadku przecinków. Błędy te oczywiście w żaden sposób nie wpływają na wartości poznawcze czy jakość badań. Jestem pod wrażeniem metodycznego przygotowania, przeglądu literaturowego jakiego podjęła się Autorka w dwóch pracach przeglądowych. W pracach eksperymentalnych również widać znakomity warsztat oraz przygotowanie do badań. Badane mechanizmy molekularne zachodzące pod wpływem badanych czynników są scharakteryzowane wielowymiarowo i z wykorzystaniem odpowiednich technik.

Całkowity dorobek naukowy Doktorantki

Mgr inż. Malwina Mularczyk ukończyła studia na kierunku Biotechnologia w 2017 roku. Powszechnie stosowane parametry wykorzystywane do oceny naukowca: indeks H czy liczba cytowań to, w jej przypadku, odpowiednio: „5” oraz „108”. Doktorantka jest autorką i współautorką 15 prac, których łączny IF wynosi 72,053. Autorka jest/ była członkiem zespołu realizującym 10

projektów naukowych oraz kierownikiem jednego projektu o wartości 60 000 zł. Dorobek, na obecny stan kariery naukowej, oceniam jako wręcz imponujący zważywszy na krótki okres (6 lat) od ukończenia studiów. Niewątpliwie jest to zasługa nie tylko samej Doktorantki, ale całego zespołu badawczego, którego jest członkiem oraz Promotora. Nie zmienia to faktu, że wskazany dorobek świadczy o zaangażowaniu Doktorantki w badania naukowe, pracowitości, pasji odkrywania oraz umiejętności pracy w zespole.

Wniosek do Wysokiej Rady

Przedstawiona do oceny praca mgr inż. Malwiny Mularczyk stanowi znaczny dorobek naukowy Autorki, spełnia wymagania stawiane pracom na stopień naukowy doktora i w pełni odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U . 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Malwiny Mularczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość naukową i potencjał praktyczny opisanych w pracy badań, wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy.

Piotr Bąska

Dr hab. inż. Piotr Bąska, Profesor SGGW