



Poznań 24.05.2024

### RECENZJA

**Pracy doktorskiej Pana mgr Pawła Pawelczaka pt.: „Właściwości przeciwstarzeniowe 4-N-furfurylocytozyny w modelach komórkowym, drożdżowym i mysim” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Elizy Wyszko i promotora pomocniczego dr Agnieszki Fedoruk-Wyszomirskiej w Pracowni Analiz Struktur Subkomórkowych Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.**

Tematyka, która została podjęta w rozprawie doktorskiej Pana mgr Pawła Pawelczaka dotyczy coraz bardziej aktualnych zagadnień poszukiwania nowych strategii terapeutycznych, które mogą zostać użyte w przeciwdziałaniu starzeniu się organizmu człowieka i chorób będących konsekwencją tego procesu. Z uwagi na fakt, że starzenie się społeczeństwa i wynikająca z tego faktu zapadalność na choroby związane z tym procesem jest jednym z głównych wyzwań zdrowotnych w krajach wysoko rozwiniętych, podjęty przez Doktoranta temat wydaje się być szczególnie aktualny i istotny. W laboratoriach na całym świecie poszukiwane są aktywne cząsteczki umożliwiające powstrzymanie efektów procesu starzenia przy minimalnych i akceptowalnych dla pacjenta efektach ubocznych. Obecnie największe nadzieje budzą strategie zaprojektowane tak, aby chronić komórki przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu ale także selektywnie wspierać kluczowe dla utrzymania prawidłowego funkcjonowania komórek szlaki przekazywania sygnałów i/lub szlaki metaboliczne. Takie strategie, wydają się być szczególnie interesujące i cenne nie tylko z punktu widzenia ich zastosowania w prewencji chorób związanych z zaawansowanym wiekiem ale, są one również interesujące z punktu widzenia badań podstawowych zmierzających do jeszcze lepszego poznania biologii starzenia się na poziomie komórek, tkanek czy całego organizmu. W swoich poszukiwaniach Doktorant przyjrzał się mechanizmowi działania 4-N-furfurylocytozyny (FC), nowego związku będącego pochodną cytozyny z podstawionym furfurałem w pozycji N4 wykorzystując trzy powszechnie uznane modele w badaniach nad starzeniem – prawidłowe ludzkie fibroblasty, prosty organizm jednokomórkowy jakim są drożdże *Saccharomyces cerevisiae* jak również dużo bardziej złożony model ssaczy czyli model myszy *Mus musculus*.

**Dysertacja ma typowy układ**, rozpoczyna się od spisu treści, wstępu, i celu pracy prowadzi czytelnika poprzez opis użytych materiałów oraz aparatury jak również zastosowanych metod, omówienie wyników, dyskusję, podsumowanie, wykaz rycin oraz bibliografię. Streszczenie oraz wykaz skrótów są umieszczone na początku pracy.

## **Wstęp**

W obszernym wstępie Autor przybliży czytelnikowi większość kwestii niezbędnych do zrozumienia poruszanych w pracy zagadnień. Rozdział ten rozpoczyna się od wprowadzenia do tematyki starzenia komórek, w którym Autor szczegółowo omawia podstawowe prawa i czynniki wpływające na przebieg tego procesu. Podrozdziały dotyczące cech starzenia są poświęcone cechom pierwotnym, antagonistycznym i interaktywnym, i umożliwiają pełniejsze zrozumienie złożoności procesu starzenia. Autor wyjaśnia również różnice między starzeniem replikacyjnym a przyspieszonym, a także przedstawia fizjologiczne aspekty starzenia komórkowego. Ponadto, Autor przybliży czytelnikowi wpływ stresu oksydacyjnego na proces starzenia, co jest kluczowym aspektem w kontekście badań nad potencjalnymi geroprotektorami. Szczególnie interesujący wydaje się rozdział wstępu poświęcony modelom badawczym, który przedstawia modele wykorzystywane do badania starzenia. Autor opisuje linie komórkowe, drożdże oraz myszy jako modele badawcze, przedstawiając ich zalety i ograniczenia. Równie interesujący jest rozdział dotyczący geroprotektorów, w tym senomorfików i senolityków. Autor przedstawia możliwości interwencji, które mogą spowolnić proces starzenia, szczegółowo omawiając mechanizmy działania tych związków oraz ich potencjalne zastosowania. Wstęp kończy się przedstawieniem 4-N-furfurylocytozyny sprowadzającym się jednak jedynie do prezentacji jej wzoru i informacji że po raz pierwszy związek ten został zsyntezowany w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Tak lakoniczne przedstawienie związku będącego przedmiotem rozprawy doktorskiej mogłoby budzić zawód jednak jak dotąd, poza publikacją dotyczącą aktywności FC w modelu drożdżowym przygotowaną przez Autora tej pracy wraz z zespołem oraz jeszcze jednej starszej pracy również pochodzącej z IChB PAN w Pubmed nie można znaleźć żadnej innej pracy na temat aktywności biologicznej 4-N-furfurylocytozyny co świadczy, że jest to temat nowy, a przez to niezwykle ekscytujący biorąc pod uwagę wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy. Wszystkie informacje przedstawione we wstępie stanowią doskonałą podstawę teoretyczną do zrozumienia wyboru zastosowanych technik eksperymentalnych, metodyki jak i interpretacji wyników prowadzonych przez niego badań. Podsumowując tę część rozprawy doktorskiej, można bez wahania stwierdzić, że rozdział ją otwierający bardzo dobrze spełnia swoje

zadanie wprowadzenia do podejmowanych w niej problemów badawczych. Informacje zawarte w tym rozdziale, co należy podkreślić, są poparte odpowiednio dobranym piśmiennictwem.

## **Cel pracy**

Ten rozdział przedstawia zadania badawcze, które zostały zaplanowane do wykonania w każdym z trzech modeli eksperymentalnych w celu poznania właściwości przeciwstarzeniowych 4-N-furfurylocytozyny.

## **Metodyka**

Metodyka badań jest bardzo dobrze opisana i z pewnością może być pomocna dla każdego, kto chciałby przeprowadzić podobne doświadczenia ponieważ w większości przypadków podane są niemal wszystkie niezbędne detale metodyczne. Na uwagę zasługuje szeroki wachlarz nowoczesnych metod wymagających nie tylko zastosowania zaawansowanej technologicznie aparatury ale także umiejętności jej obsługi i interpretacji wyników. Autor kolejno opisuje procedury związane z eksperymentami z 4-N-furfurylocytozyną na modelach komórkowych, drożdżowych oraz mysich. Metody obejmują m.in. test MTT, oznaczanie aktywności beta-galaktozydazy, analizy immunofluorescencyjne, analizy stresu oksydacyjnego i mitochondrialnego, techniki analityczne takie jak HPLC i PCR w czasie rzeczywistym Western blot, analizy proteomiczne jak również testy w modelu mysim w tym testy behawioralne. Całość zamyka opis zastosowanych metod statystycznych.

## **Wyniki**

Wyniki pracy są prezentowane w trzech głównych sekcjach obejmujących model komórkowy, model drożdżowy i model mysy. W każdej z tych sekcji autor przedstawia wpływ 4-N-furfurylocytozyny na różne markery procesu starzenia, opisujące funkcjonowanie mitochondriów, równowagę redox oraz ekspresję związanych z nią genów. Wyniki są przedstawione w sposób klarowny i logiczny, z odpowiednim wsparciem w postaci tabel, wykresów i zdjęć mikroskopowych, zestawione w bloki prezentujące wykresy, histogramy i zdjęcia pozwalające jednym spojrzeniem zaznajomić się z całym zestawem danych uzyskanych przy użyciu komplementarnych technik pozwalających spojrzeć na ten sam aspekt z 2 punktów widzenia jak np. cytometria przepływowa i mikroskopia fluorescencyjna. Wyniki są opatrzone komentarzami Autora przybliżającymi czytelnikowi informacje niezbędne do interpretacji prezentowanych

wyników Całości pozytywnego wrażenia dopełnia skrupulatna prezentacja istotności statystycznych obliczonych dla wyników prowadzonych eksperymentów.

## **Dyskusja**

Dyskusja wyników jest wszechstronna i dobrze odnosi się do celów pracy. Autor bardzo sprawnie porusza się w gąszczu uzyskanych przez siebie wyników, poddając je wnikliwej analizie i konfrontacji z dostępnymi danymi literaturowymi. Dyskusja, podobnie jak poprzednie rozdziały, jest podporządkowana podziałowi na modele komórkowy, drożdżowy i myszy. Jest dobrze zorganizowana i kompleksowa, co dostarcza dowodu na doskonałą znajomość tematu przez Autora tej pracy. Z uznaniem należy również wypowiedzieć się o sposobie, w jaki Autor nie tylko wyjaśnia wpływ 4-N-furfurylocytozyny na opóźnianie efektów starzenia w każdym z zastosowanych modeli, ale zamienia dyskusję w ciąg przyczynowo skutkowy, uzasadniając swoje decyzje dotyczące doboru markerów procesu starzenia, które oznaczał, oraz metod badawczych, których zamierzał w tym celu użyć, co jest kluczowe dla zrozumienia wyników zaprezentowanych przez niego badań.

## **Podsumowanie**

W części zatytułowanej „Podsumowanie” czytelnik może znaleźć szereg wniosków ujmujących w jedną całość i podkreślających najważniejsze wyniki uzyskane w pracy, która co warto jeszcze raz podkreślić, stanowi pierwszy tak obszerny opis aktywności biologicznej 4-N-furfurylocytozyny ze szczególnym naciskiem na jej właściwości przeciwstarzeniowe prezentując obiecujące efekty w każdym z trzech zastosowanych modeli badawczych. Wyniki badań wykazały, że FC wydłuża długość życia drożdży poprzez ograniczenie aktywności szlaku TORC1/Sch9, co skutkuje aktywacją metabolizmu mitochondrialnego. Wykazano również właściwości senomorficzne, ograniczając rozwój starzenia komórkowego w modelu 2D poprzez redukcję poziomu uszkodzeń DNA, stresu oksydacyjnego i aktywację proteasomu. Autor wykazał również, że związek nie jest toksyczny dla zwierząt, pokonuje barierę krew-mózg, ogranicza poziom markerów oksydacyjnych uszkodzeń DNA, lipidów i białek we wszystkich analizowanych tkankach myszy, opóźnia związaną z wiekiem utratę funkcji lokomotorycznych starych myszy oraz zwiększa stosunek masy mięśniowej do całkowitej masy ciała, co sugeruje również wpływ tego związku na spowolnienie rozwoju sarkopenii. Mimo wspólnego efektu działania związku we wszystkich trzech modelach wskazujące na skuteczność FC w opóźnianiu procesu starzenia Autor, zaobserwował również różnice w działaniu FC takie jak zwiększenie poziomu oddychania u drożdży i zmniejszenie w przypadku modelu fibroblastów hodowanych w modelu 2D.

## **Piśmiennictwo, streszczenia**

Pracę zamyka lista piśmiennictwa zawierająca 284 pozycje. Piśmiennictwo jest bardzo dobrze dobrane, aktualne, w całości anglojęzyczne i prawidłowo uporządkowane. Praca zawiera też streszczenie w języku polskim i angielskim.

### **Aspekty edytorskie i formalne**

Pod tym względem praca przygotowana jest perfekcyjnie, ryciny w sekcji wyników są przygotowane bardzo starannie, dobre wrażenie robią też, szkoda że tak nieliczne, ryciny we wstępie. W tekście trudno jest doszukać literówek, natomiast można wskazać na pewnie niedociągnięcia natury stylistycznej czy kalki z języka angielskiego w które obfituje zwłaszcza wstęp jak na przykład kilkakrotnie użyte określenie „areszt cyklu komórkowego” (str. 18), czy raczej niefortunne zdanie ze strony 19 „Deregulacji ulega również dynamika mitochondriów, kontrolowana przez procesy fizji (łączenia) i fuzji (podziałów)” czy też zdanie: „asymetryczny podział komórki pozwalający zachować komórki potomne od uszkodzeń przodków” (str. 29) Raczej chyba też nie można zgodzić się ze stwierdzeniem że geroprotektory to „działania” (str 32). Resweratrol nie jest flawonoidem jak to wspomniano dwukrotnie na stronie 33. Ponadto tak jak wspomniano powyżej metodyka jak i opis wyników są bardzo dobrze opisane natomiast zdarzają się pojedyncze sytuacje które mogą budzić o czytelnika niedosyt w kontekście eksperymentów opisywanych przez Autora. Brakuje np. informacji co to znaczy że komórki HaCaT zostały unieśmiertelnione w jaki sposób to uzyskano? Jak dokładnie działają sondy fluorescencyjne CellROX, CellEvent i JC1 użyte w eksperymentach? Autor wspomniał jedynie w jednym zdaniu o mechanizmie działania sondy CellROX „emitującej silną fluorescencję na skutek utlenienia pod wpływem RFT” w tym kontekście rodzą się jednak pytania: czy wszystkie RFT w jednakowym stopniu reagują z sondą CellROX? Na ile precyzyjnie sonda ta może być użyta do „pomiaru poziomu wewnątrzkomórkowych RFT”?

**Podsumowując, uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi systemowe i kompleksowe rozwiązanie postawionego przez Doktoranta problemu badawczego, świadcząc o jego dojrzałości naukowej. Pan mgr Paweł Pawelczak podjął się analizy zagadnień o istotnym znaczeniu zarówno dla terapii chorób związanych z procesem starzenia, jak i dla rozwoju nauk podstawowych. W pracy zastosowano szereg metod, które wymagały zarówno zrozumienia zasad ich działania, jak i umiejętności interpretacji danych oraz ich integracji w szerszy kontekst problemu badawczego. Doktorant doskonale poradził sobie z tym zadaniem, dostarczając wnikliwe analizy uzyskanych danych i umiejętnie wpisując je w kontekst istniejącej literatury naukowej.**

Biorąc pod uwagę powyższe argumenty, oceniam pracę bardzo wysoko i wnoszę o jej wyróżnienie. Wypełniając wymóg stawiany przed tego rodzaju recenzjami z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 56/2023/Internet z dnia 29 marca 2023 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pana mgr Pawła Pawelczaka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.