Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn
Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 29 kwietnia 2024 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej**
**Pana magistra Pawła Pawelczaka**
**pt. „Właściwości przeciwstarzeniowe 4-N-furfurylocytozyny w modelach komórkowym, drożdżowym i mysim"**

Procesy starzenia się są tak powszechne w naturze jak też mało dotychczas zrozumiane w aspekcie ich mechanizmów biologicznych. Z drugiej strony, budzą ogromne zainteresowanie głównie od strony przeciwdziałania im czy choćby ograniczania ich postępu. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska, złożona w postaci tradycyjnego manuskryptu (dysertacji), dotyczy tego właśnie zagadnienia, a mianowicie zbadania właściwości przeciwstarzeniowych syntetycznego związku chemicznego, 4-*N*-furfurylocytozyny. W badaniach użyto trzech modeli biologicznych – hodowli komórek ludzkich, drożdży piekarskich oraz myszy. Wybór tych modeli należy uznać za trafny, gdyż są one z jednej strony zróżnicowane, co pozwalało zbadać różne aspekty testowanego zjawiska, a z drugiej strony są powszechnie uznane w tego typu pracach badawczych.

W swojej Pracy Pan mgr Paweł Pawelczak zastosował całą gamę metod, pozwalających mu na określenie wielu różnych parametrów biologicznych mogących wskazywać na intensywność procesów starzenia się oraz na efektywność działania przeciwstarzeniowego badanego związku. Większość technik Doktorant zastosował poprawnie, co pozwoliło mu na wyciągnięcie wniosków dotyczących efektywności 4-*N*-furfurylocytozyny jako cząsteczki o właściwościach przeciwstarzeniowych.

Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański

tel. (58) 523 6024
fax. (58) 523 5501
e-mail: grzegorz.wegrzyn@ug.edu.pl

ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
www.biology.ug.edu.pl

Najważniejsze osiągnięcia recenzowanej pracy doktorskiej można streścić następująco. Pan mgr Paweł Pawelczak wykazał, że dodana po pożywki w hodowli ludzkich fibroblastów 4-*N*-furfurylocytozyna wykazuje właściwości senomorficzne, ograniczając starzenie komórkowe. Związek ten wywołuje obniżenie poziomu uszkodzeń DNA oraz stresu oksydacyjnego, powoduje natomiast aktywację proteasomu. Ponadto Doktorant stwierdził, że 4-*N*-furfurylocytozyna ogranicza poziom oddychania komórkowego, najprawdopodobniej poprzez obniżenie liczby mitochondriów o zdepolaryzowanej błonie mitochondrialnej. Co ciekawe, nie koreluje to ze zmniejszoną żywotnością komórek ani obniżonym poziomem ATP. W przypadku modelu jednokomórkowego organizmu eukariotycznego, Pan mgr Paweł Pawelczak odkrył, że 4-*N*-furfurylocytozyna wydłuża chronologiczną długość życia drożdży. Było to skorelowane z ograniczeniem aktywności szlaku TORC1/Sch9, co może skutkować aktywacją metabolizmu mitochondrialnego. Badając działanie 4-*N*-furfurylocytozyny z użyciem modelu mysiego, Doktorant wykazał, że związek ten nie jest toksyczny dla zwierząt (przynajmniej w zakresie stosowanych stężeń) oraz pokonuje barierę krew-mózg. Doustne podanie 4-*N*-furfurylocytozyny skutkowało zmniejszeniem poziomów markerów oksydacyjnych uszkodzeń DNA, lipidów i białek w tkankach mysich. Obserwowana była w tych warunkach opóźniona utrata funkcji lokomotorycznych u starszych myszy. Ponadto Doktorant obserwował zwiększony stosunek masy mięśniowej do całkowitej masy ciała u myszy, którym podawano 4-*N*-furfurylocytozynę.

Biorąc pod uwagę opisane powyżej w dużym skrócie efekty przeprowadzonych badań, Pan mgr Paweł Pawelczak wnioskuje, że 4-*N*-furfurylocytozyna może być potencjalnie efektywnym związkiem przeciwstarzeniowym, zasługującym na uwagę jako ewentualny lek lub substancja spowalniająca procesy starzenia. Na podstawie powyższego, a także ogólnie poprawnie napisanego rozdziału pt. „Wstęp", w którym omówione zostały procesy starzenia się oraz stosowane w badaniach modele biologiczne, można jednoznacznie

Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański

tel. (58) 523 6024
fax. (58) 523 5501
e-mail: grzegorz.wegrzyn@ug.edu.pl

ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
www.biology.ug.edu.pl

WYDZIAŁ BIOLOGII
UNIWERSYTET GDAŃSKI

stwierdzić, że Doktorant wykazał się wiedzą teoretyczną w zakresie prowadzonych badań oraz rozwiązał problem naukowy. Spełnił zatem wymagania merytoryczne stawiane kandydatom do stopnia doktora.

Lektura tej bardzo ciekawej rozprawy doktorskiej nasunęła mi szereg uwag i pytań, do których ustosunkowania się zachęcam Doktoranta podczas publicznej obrony tej rozprawy.

1. Jakie były przesłanki do syntezy 4-*N*-furfurylocytozyny i zbadania jej właściwości przeciwstarzeniowych? We rozprawie czytamy tylko gdzie ten związek został zsyntetyzowany oraz że nie został wcześniej zbadany pod względem funkcji przeciwstarzeniowych. Tymczasem przecież związków chemicznych nie syntetyzuje się bezcelowo a potem bada ich aktywności, tylko specyficzne pochodne danego związku projektuje się nad podstawie różnych przesłanek dotyczących ich spodziewanej aktywności. W rozprawie nie ma żadnego opisu historii badań nad 4-*N*-furfurylocytozyną ani informacji dlaczego akurat ten związek został wybrany do badań. Jest to w istocie najpoważniejszy słaby punkt tej pracy.
2. W pracy nie podjęto się zbadania molekularnego mechanizmu działania 4-*N*-furfurylocytozyny ani określenia co jest molekularnym celem działania tej cząsteczki. Określenie wpływu badanego związku na różne procesy komórkowe czy biochemiczne wskazuje na jego efekty biologiczne, ale nie daje jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o molekularny mechanizm działania, ani o to z jakimi związkami oddziałuje w komórkach. W tym świetle, tym bardziej dziwi brak wskazania założeń, na podstawie których wybrano 4-*N*-furfurylocytozynę do badań. Czy spodziewano się, że związek ten może oddziaływać z jakimś konkretnym białkiem komórkowym albo z innymi biologicznie aktywnymi cząsteczkami obecnymi w komórkach?

Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański

tel. (58) 523 6024
fax. (58) 523 5501
e-mail: grzegorz.wegrzyn@ug.edu.pl

ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
www.biology.ug.edu.pl

WYDZIAŁ BIOLOGII
UNIWERSYTET GDAŃSKI

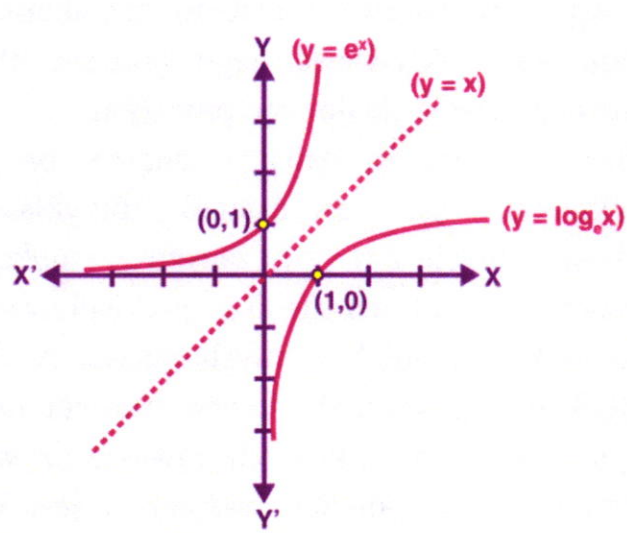
3. Nazwanie modelu ludzkich fibroblastów „modelem komórkowym" w tej pracy – a nawet w jej tytule – jest dość niefortunne, gdyż przecież model drożdżowy też jest modelem komórkowym. Może być to mylące dla czytelnika. Uważam, że lepiej było zastosować termin „model ludzkich fibroblastów" albo „model komórek ludzkich".
4. Na str. 11 czytamy (cytat): „FC nie jest związkiem toksycznym (...) jednak **mityguje** cechy starzenia komórkowego" (podkreślenie recenzenta). Słowo „mityguje" jest zapewne w tym przypadku „kalką językową", czyli bezpośrednim przeniesieniem z angielskiego *mitigate*, co oznacza „łagodzić". Jednak jest to pewna „pułapka językowa", gdyż w języku polskim słowo „mitygować" oznacza (za Słownikiem Języka Polskiego PWN; https://sjp.pwn.pl/slowniki) „zwracać komuś uwagę na niestosowne zachowanie, hamować czyjąś zapalczywość". Nie sądzę aby Doktorant uważał, że starzenie się jest zachowaniem niestosownym, a raczej chciał wskazać na łagodzenie cech starzenia komórkowego. Lepiej było zatem użyć tradycyjnego polskiego sformułowania.
5. Na str. 19 zamienione są znaczenia terminów „fizja" i „fuzja" (to pierwsze oznacza podział a drugie łączenie się, a nie odwrotnie, jak podano w pracy).
6. W pracy wielokrotnie opisuje się „fazę wzrostu logarytmicznego" hodowli komórek. W rzeczywistości, jeśli mówimy o tego typu wzroście, gdy z jednej komórki powstają w danym czasie dwie po podziale, z dwóch - cztery (po upływie takiego samego czasu), z czterech – osiem, z ośmiu – szesnaście, itd., to jest to wzrost wykładniczy, a nie logarytmiczny. Jest to co prawda często spotykany błąd, ale jednak błąd matematyczny. Dla zobrazowania przedstawiam poniższą rycinę, na której przedstawiono przebieg funkcji wykładniczej (górna krzywa), liniowej (środkowa) i logarytmicznej (dolna):

Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański

tel. (58) 523 6024
fax. (58) 523 5501
e-mail: grzegorz.wegrzyn@ug.edu.pl

ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
www.biology.ug.edu.pl

WYDZIAŁ BIOLOGII
UNIWERSYTET GDAŃSKI




Wzrost hodowli komórek przy potencjalnie nieograniczonym dostępie do wszystkich niezbędnych czynników obrazuje górna krzywa (funkcja wykładnicza) a nie dolna (funkcja logarytmiczna), zatem powinno się mówić o „fazie wzrostu wykładniczego" a nie o „fazie wzrostu logarytmicznego".

7. W rozdziale 4.1.4. Doktorant opisuje wyniki doświadczeń, które Jego zdaniem wskazują na stymulację procesu autofagii w obecności 4-*N*-furfurylocytozyny. Wyniki te nie są jednak tak jednoznaczne, jak wynikałoby z opisu ich analizy. Po pierwsze, o stymulacji autofagii świadczy raczej wzrost poziomu formy II białka LC3 (czyli LC3-II), a nie obu form (LC3-I i LC3-II); niekiedy wręcz wskazane jest wzięcie pod uwagę nie samej ilości LC3-II, a stosunku poziomu LC3-II do poziomu LC3-I i dopiero podwyższenie wartości tego stosunku można uznać za wskaźnik stymulacji autofagii. Ponadto, wzrost poziomu białka p62 (co zaobserwował Doktorant w przypadku użycia 4-*N*-furfurylocytozyny) świadczy o zahamowaniu autofagii, a nie o jej stymulacji. Białko p62 rozpoznaje bowiem substraty autofagii, które są

Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański

tel. (58) 523 6024
fax. (58) 523 5501
e-mail: grzegorz.wegrzyn@ug.edu.pl

ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
www.biology.ug.edu.pl

WYDZIAŁ BIOLOGII
UNIWERSYTET GDAŃSKI

następnie degradowane, dlatego jego akumulacja świadczy zazwyczaj o obniżonej efektywności tego procesu. Proszę zatem Doktoranta o ustosunkowanie się do tego problemu.

8. Nieco szkoda, że opisując analizy proteomiczne (rozdział 4.1.5.) Doktorant nie przedstawił przykładów konkretnych białek rybosomalnych czy związanych z funkcjami spliceosomu, których poziomy są istotnie zmienione pod wpływam 4-N-furfurylocytozyny.
9. Co Doktorant miał na myśli pisząc, że 4-*N*-furfurylocytozyna może „delikatnie zwiększać" tempo wzrostu drożdży (str. 84)? W opisie wyników badań naukowych powinno używać się precyzyjnego języka. Jednak w tym punkcie ważniejszy jest inny aspekt. Mianowicie w kolejnym zdaniu czytamy (cytat): „Różnice jednak nie są istotne statystycznie". Taką interpretację wyników, gdzie wskazuje się na zwiększenie albo zmniejszenie wartości jakiegoś mierzonego parametru, ale brak jest istotnych statystycznie różnić pomiędzy porównywanymi grupami, uważam za nieprawidłową. Analiza statystyczna ma bowiem wskazać, czy obserwowane różnice w wartościach średnich, medianach, itd. można uznać za faktycznie istniejące pomiędzy badanymi grupami czy też wynikają one jedynie z przypadkowej fluktuacji wyników i różnic wewnątrzpopulacyjnych. Przy takim podejściu, brak istotnych statystycznie różnic należy intepretować jako nieodróżnialność jednej grupy od drugiej pod względem badanego parametru, a istnienie różnych zmierzonych wartości należy przypisać przypadkowym fluktuacjom i zmienności osobniczej wewnątrz badanych grup.
10. Na Rysunku 23A (str. 85) nie zaznaczono różnic istotnych statystycznie, mimo że opisane są one w tekście (str. 84); natomiast na Rysunku 23B brak jest różnic istotnych statystycznie.

Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański

tel. (58) 523 6024
fax. (58) 523 5501
e-mail: grzegorz.wegrzyn@ug.edu.pl

ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
www.biology.ug.edu.pl

WYDZIAŁ BIOLOGII
UNIWERSYTET GDAŃSKI

11. Tabela 3 (str. 86) jest nieprawidłowo skonstruowana. Wspólny tytuł czterech kolumn (od kolumny 2 do kolumny 5) powinien brzmieć „Średni odsetek (%±SD) komórek żywych", a nie „FC [mM]", natomiast pod tym ogólnym tytułem powinien być umieszczony podtytuł dla każdej kolumny (od 2 do 5), brzmiący odpowiednio: „0 mM FC", „0,25 mM FC", „0,5 mM FC", „1,0 mM FC". W przeciwnym razie, przy obecnym kształcie tabeli, formalnie należałoby odczytać, że wartości stężenia FC w poszczególnych doświadczeniach wynosiły 99,4±0,001 mM; 99,6±0,007 mM; 99,7±0,002 mM; itd., co jest oczywiście nieprawdą.
12. W jaki sposób określano ilościowo żywotność drożdży w doświadczeniach, których wyniki zaprezentowane są na Rysunku 28E (str. 93)? Czy poprzez określanie liczby żywych komórek tworzących kolonie, czy w jakiś inny sposób? Czy różnice uzyskanych wartości pomiędzy poszczególnym wariantami doświadczenia były istotne statystycznie?
13. Dlaczego w doświadczeniach kontrolnych przeprowadzanych z użyciem modelu mysiego (rozdział 4.3.) używano kinetyny? Skąd wybór tego a nie innego związku jako kontroli pozytywnej?
14. Analizując schemat doświadczenia przedstawiony na Rysunku 30 (str. 96) nasuwa się pytanie dlaczego nie porównano średniej długości życia myszy, którym podawano 4-*N*-furfurylocytozynę oraz myszy kontrolnych? Takie doświadczenie mogłoby w prosty sposób wskazać na potencjał przeciwstarzeniowy badanego związku na poziomie organizmu ssaka.
15. Na Rysunku 32 (str. 97) przedstawione są wyniki wskazujące na przekraczanie bariery krwio-mózgowej przez 4-*N*-furfurylocytozynę. Są

Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański

tel. (58) 523 6024
fax. (58) 523 5501
e-mail: grzegorz.wegrzyn@ug.edu.pl

ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
www.biology.ug.edu.pl

WYDZIAŁ BIOLOGII
UNIWERSYTET GDAŃSKI

to jednak wyniki jakościowe. Ciekawym byłoby zbadanie efektywności przekraczania tej bariery przez badany związek.

16. Na str. 102 czytamy (cytat): „w porównaniu do grypy zwierząt". Rozumiem, że Doktorantowi chodziło o grupę zwierząt, gdyż ani wirus grypy ani też sama choroba nie były w tej pracy badane.
17. W spisie literatury (rozdział 7 – Bibliografia), w przypadku licznych prac brak jest pełnych danych bibliograficznych. Najczęściej braki te dotyczą nie podania stron na jakich zamieszczony został artykuł w danym woluminie czasopisma albo nie podania numeru artykułu; dotyczy to następujących dwudziestu siedmiu pozycji: 11, 25, 30, 33, 63, 73, 74, 78, 82, 97, 114, 121, 123, 127, 128, 131, 174, 179, 197, 222, 226, 236, 254, 255, 257, 274, 275. Ponadto w przypadku pozycji 81 nie podano ani nazwisk autorów, ani nazwy czasopisma, ani roku wydania pracy, ani numeru woluminu, ani stron bądź numeru artykułu; zaś w przypadku pozycji 259 błędnie podano, że cytowany artykuł ukazał się na stronach 1-11 woluminu 4 czasopisma *NPJ Aging and Mechanisms of Disease*, gdy tymczasem artykuł ten ma nr 3 w tym woluminie (czasopismo to nie stosuje numeracji stron, na których artykuły są w nim publikowane, tylko numerację artykułów).

Jak widać z powyższego, moje uwagi są liczne, jednak nie podważają faktu, że Pan magister Paweł Pawelczak opanował wiedzę teoretyczną z zakresu mechanizmów starzenia się organizmów oraz metod ich badania i poszukiwania potencjalnych leków przeciwstarzeniowych, a także potrafił zaplanować badania, wykonać doświadczenia i zanalizować ich wyniki, co doprowadziło do rozwiązania problemu naukowego w postaci wykazania, że 4-*N*-furfurylocytozyna ma potencjalne właściwości przeciwstarzeniowe, wpływając na szereg procesów komórkowych i modulując fizjologię i zachowanie zwierząt doświadczalnych. Doktorant przedstawił również rozprawę, w której opisał uzyskane przez siebie wyniki i wysnuł wnioski.

Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański

tel. (58) 523 6024
fax. (58) 523 5501
e-mail: grzegorz.wegrzyn@ug.edu.pl

ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
www.biology.ug.edu.pl

WYDZIAŁ BIOLOGII
UNIWERSYTET GDAŃSKI

Uniwersytet Gdański | Związek Uczelni Fahrenheita

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. 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 Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej IChB PAN nr 56/2023 z dnia 29 marca 2023 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pana magistra Pawła Pawelczaka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze, w dyscyplinie nauki biologiczne.

*prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn*

**Katedra Biologii Molekularnej**
**Wydział Biologii**
**Uniwersytet Gdański**

tel. (58) 523 6024
fax. (58) 523 5501
e-mail: grzegorz.wegrzyn@ug.edu.pl

ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
www.biology.ug.edu.pl

WYDZIAŁ BIOLOGII
UNIWERSYTET GDAŃSKI

9