

Poznań, 21.07.2022

Dr hab. Monika Gąsecka, prof. UPP  
Katedra Chemii  
Wydział Leśny i Technologii Drewna  
ul. Wojska Polskiego 75  
60-625 Poznań

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Włodarczyk  
pt. „Potencjał biologiczny wybranych gatunków grzybów uprawnych w profilaktyce  
chorób cywilizacyjnych”**

Podstawą sporządzenia recenzji jest pismo Pana Prof. dr. hab. Jacka Sapa, Dziekana Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie z dnia 2.06.2022, informujące o powierzeniu mi funkcji recenzenta w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora mgr Annie Włodarczyk przez Radę Dyscypliny Nauki farmaceutyczne UJ na posiedzeniu w dniu 30.05.2022.

**Ocena formalna**

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anny Włodarczyk pt. „Potencjał biologiczny wybranych gatunków grzybów uprawnych w profilaktyce chorób cywilizacyjnych” wykonana została pod kierunkiem promotora Pani Prof. dr hab. Bożeny Muszyńskiej oraz promotora pomocniczego Pani dr inż. Agaty Krakowskiej w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum.

Dysertacja powstała w oparciu o cykl 5 publikacji naukowych, z których 4 są pracami eksperymentalnymi, a jedna jest pracą przeglądową. Wszystkie przedstawione publikacje są współautorskie, a Doktorantka jest pierwszym autorem dwóch przedstawionych publikacji. Na podstawie oświadczeń złożonych przez współautorów udział Pani mgr Anny Włodarczyk w publikacjach wynosił odpowiednio:

- I. Muszyńska B., Włodarczyk A., Kała K., Lazur J., Zięba P. (2019). Znaczenie grzybów jadalnych w chorobach immunologicznych. *Medycyna komplementarna w chorobach metabolicznych i autoimmunologicznych*, 13-43. ISBN 987-83-64534-23-2 **(50%)**
- II. Muszyńska B., Kała K., Włodarczyk A., Krakowska A., Ostachowicz B., Gdula-Argasińska J., Suchocki P. (2020). *Lentinula edodes* as a source of bioelements released into artificial digestive juices and potential anti-inflammatory material. *Biological Trace Element Research*, 194(2), 603-613. **(35%)**
- III. Muszyńska B., Szacawa E., Bederska-Łojewska D., Dudek K., Pomierny B., Włodarczyk A., Kała K., Lazur J., Suchocki J., Budziszewska B., Bednarek D., Pieszka M. (2020). Preliminary study on Se-enriched *Lentinula edodes* mycelium as a proposal of new feed additive in selenium deficiency. *PLoS One*, 15(5):e02334556. **(29%)**
- IV. Włodarczyk A., Fijałkowska A., Jedrejko K., Zięba P., Lazur J., Sułkowska-Ziaja K., Muszyńska B. (2020). Edible and medicinal mushroom *Hericium erinaceus* as a potential natural material with influence on brain functions. *Medicina Internacia Revuo*, 29(1), 4-10. **(50%)**
- V. Włodarczyk A., Krakowska A., Sułkowska-Ziaja K., Suchanek M., Zięba P., Opoka W., Muszyńska B. (2021). *Pleurotus* spp mycelia enriched in magnesium and zinc salts as potential functional food. *Molecules*, 26(1), 162. **(42%)**

Współautorzy jednocześnie wyrazili zgodę na przedłożenie publikacji przez Panią mgr Annę Włodarczyk jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów. Łączny impact factor publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej wynosi 11,389, a punktacja MNiSW 275 punktów.

Rozprawa liczy 118 stron, na których znajdują się następujące rozdziały: Streszczenie w języku polskim (2 strony), Abstract w języku angielskim (2 strony), Wstęp (40 stron), Cele i założenia pracy (2 strony), Materiały i metody (15 stron), Wyniki i dyskusja (21 stron), Podsumowanie i wnioski (4 strony), Piśmiennictwo (17 stron), Spis fotografii, tabel i rycin (łącznie 2 strony) oraz Spis dorobku naukowego mgr Anny Włodarczyk (5 stron). Ponadto opracowanie zawiera artykuły wchodzące w skład cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską. Oświadczenia współautorów stanowią odrębne załączniki.

### **Ocena merytoryczna**

Spośród około 100 gatunków grzybów, które można uprawiać komercyjnie, zaledwie 10 gatunków uprawianych jest na skalę przemysłową. Polska należy do czołowych

producentów pieczarki dwuzarodnikowej (*Agaricus bisporus*) oraz bocznika ostrygowatego (*Pleurotus ostreatus*) w Europie. Na rynku dostępne bywają również inne, mniej znane w Polsce, za to popularne i spożywane w innych krajach, grzyby uprawne takie jak twardnik japoński (dawniej twardziak jadalny) (*Lentinula edodes*), bocznik eryngii (*Pleurotus eryngii*), bocznik różowy (*Pleurotus djamor*), bocznik żółty (*Pleurotus citrinopileatus*), łuskwiak nameko (*Pholiata nameko*) czy też podblaszek marmurkowaty (*Hypsizygus marmoreus*). Wiele gatunków zaliczanych jest do grzybów leczniczych i wykorzystywanych jest od czasów starożytnych w tradycyjnej medycynie w Azji. Obecnie grzyby cenione są nie tylko ze względu na aromat wzbogacający smak wielu potraw, lecz przede wszystkim stanowią źródło cennych substancji wywierających pozytywny wpływ na zdrowie i metabolizm człowieka.

Zawartość związków bioaktywnych takich jak: polisacharydy, białka, niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe, błonnik pokarmowy, witaminy oraz makro- i mikroelementy, przeciwutleniacze, sterole, alkaloidy itd. sprawia, że grzyby można zaliczyć do żywności funkcjonalnej. Badania ostatnich lat wskazują, że grzyby stanowią istotny element w profilaktyce, a nawet wspomaganie leczenia wielu chorób. Podjęty przez Panią mgr Annę Włodarczyk temat pracy jest bardzo istotny, gdyż dynamiczny rozwój gospodarczy i społeczny obserwowany w ostatnich dekadach niesie za sobą również negatywne skutki, jakimi jest zachorowalność między innymi na choroby cywilizacyjne. Masowa skala występowania tych chorób przyczynia się aż do 80% wszystkich zgonów na świecie i niesie poważne konsekwencje ekonomiczne. Podjęta przez Doktorantkę ocena potencjału biologicznego grzybów w profilaktyce tych chorób jest więc w pełni zasadna. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną, która pozwoliła na postawienie tezy, wytyczenie celów oraz przeprowadzenie doświadczeń, które zaowocowały opublikowaniem wartościowych prac będących przedmiotem niniejszej rozprawy .

Streszczenie dysertacji w sposób zwięzły przedstawia uzasadnienie wyboru tematu, cel pracy oraz bardzo krótkie omówienie otrzymanych wyników. Jednak pierwsze i ostatnie zdanie streszczenia są niemal identyczne. Abstract stanowi wersję anglojęzyczną ww. streszczenia.

We Wstępie Doktorantka skupia się na omówieniu genezy chorób cywilizacyjnych oraz wpływie diety na niektóre z nich. Wstęp zakończony jest krótką informacją dotyczącą celu pracy i doboru materiału do badań. Moim zdaniem zabrakło w tym miejscu szerszego uzasadnienia kryterium wyboru gatunków, a informacja „wybrano popularne gatunki grzybów uprawnych” jest nieprecyzyjna.

W kolejnych podrozdziałach Wstępu omówione zostały wybrane gatunki grzybów (*Lentinula edodes*, *Herichium erinaceus*, grzyby z rodzaju *Pleurotus*), pod kątem zawartości

substancji biologiczne czynnych o właściwościach prozdrowotnych. Ta część rozprawy wzbogacona jest zdjęciami wybranych gatunków grzybów z upraw własnych Pana Piotra Zięby. W następnych podrozdziałach znajduje się opis biopierwiastków. Zarówno Streszczenie jak i Wstęp zawierają wiele cennych informacji, jednak miejscami te części dysertacji sprawiają wrażenie chaotycznych ze względu na powtarzające się informacje, zbyt długie zdania, niepoprawne pod względem stylistycznym. Ponadto niektóre informacje nie zostały poparte cytowaniem literatury np. str. 44 informacja o zawartości Se w 200 gatunkach grzybów. W rozdziale 3.2.4. Doktorantka wskazuje, że dzienne zapotrzebowanie na selen wynosi 60  $\mu\text{g/g}$  a dawki powyżej 800  $\mu\text{g/g}$  powodują zatrucia. Proszę o wyjaśnienie kwestii jednostki dziennej dawki zapotrzebowania na Se. We Wstępie, który jest przeglądem literatury Doktorantka używa też sformułowania „w przeprowadzonych badaniach wskazano” (rozdział 3.3.1). Takie budowanie zdań nie pozwala ocenić, czy są to wyniki Doktorantki, czy dane uzyskane z publikacji innych autorów. Moim zdaniem Wstęp jest zbyt długi w porównaniu z omówieniem bardzo ciekawych wyników badań uzyskanych przez Panią mgr Annę Włodarczyk.

Kolejną część dysertacji stanowi szczegółowe omówienie celu oraz też rozprawy doktorskiej.

Rozdział Materiały i metody zawiera szczegółowy opis zastosowanych odczynników, pozyskiwania materiału do badań (wzbogacony zdjęciami Doktorantki oraz Pani Prof. dr hab. B. Muszyńskiej) oraz zastosowanych technik analitycznych.

Kolejny rozdział przedstawionej dysertacji zawiera syntetyczny opis wyników oraz dyskusję. W rozdziale tym Pani mgr Anna Włodarczyk prezentuje wyniki badań przedstawione w publikacjach o numerach II do V (wg. wykazu publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej). Praca nr I, której maszynopis został dołączony do dysertacji, jest pracą przeglądową. W podrozdziale 6.1. „Wyniki oznaczania zawartości biopierwiastków” za szczególnie cenne wydaje mi się podjęcie badań dotyczących zastosowania wzbogacanych selenem preparatów grzybowych w diecie cieląt. Doktorantka wykazała się dużą dojrzałością w podejściu do tego tematu, gdyż najpierw podjęła się oceny cytotoksyczności ekstraktów grzybowych uzyskanych dla *L. endodes* fortyfikowanych solami selenu. Następnym etapem było podawanie cielętom pasz z preparatem grzybowo-selenowym i ocena wybranych parametrów dobrostanu zwierząt np. masy cieląt, liczby białych krwinek, stężenia Se w surowicy krwi. W podrozdziale tym Doktorantka nie ustrzegła się jednak pewnych niedociągnięć. Moim zdaniem sam tytuł podrozdziału jest zbyt syntetyczny w stosunku do treści. Rozdział napisany jest nieco chaotycznie, zwłaszcza dyskusja dotycząca podawania

zwierzętom preparatów z selenem. Podzielenie tego rozdziału na mniejsze podrozdziały byłoby bardziej czytelne. Niezrozumiałe jest np. zamieszczanie wyników badań dotyczących wzbogacania solami Zn i Mg kultur *in vitro* grzybów z gatunku *Pleurotus* pod wynikami i dyskusją dotyczącą suplementacji pasz dla cieląt preparatami grzybowo-selenowymi. Omówienie wyników badań dla ekstraktów z owocników i biomasy uzyskanej z kultur *in vitro* dla *L. endodes* zawartych w Tabeli 7 jest zbyt syntetyczne, a informacje pod tabelą niezrozumiałe („Test Tukeya-Kramera posłużył do wykazania różnic pomiędzy parami grup pierwiastków w rzędach w porównaniu z owocnikami, grzybnią kontrolną i pożywką kontrolną, zaznaczono te same litery, dla których różnice w treści są istotne statystycznie”).

Na stronie 71 Doktorantka używa sformułowania „skumulowane właściwości grzybni”, które jest dla mnie niejasne. Cytowanie rycin 8 i 9 powinno zależeć się na stronie 73 w pierwszym zdaniu. Zdanie drugie na stronie 73 omawiające wyniki testów MTT i LDH jest bardzo trudne w odbiorze i zawiera sformułowanie „sama grzybnia *L. endodes* nie działała”, które moim zdaniem jest wyrażeniem potocznym i nie powinno się znaleźć w omawianiu wyników naukowych. Podobnie jak sformułowanie „ponad co najmniej 200- krotnie wyższa” znajdujące się w kolejnym akapicie. Doktorantka powtórzyła również informacje ze strony 45. Ryciny 10 i 11 mają błędy edytorskie w postaci braku indeksu dolnego, czy niezastosowania pochylenia kursywy tzw. „italica” w nazwach grzybów.

W podrozdziale 6.1.1. Doktorantka podejmuje się oceny zawartości biopierwiastków po ekstrakcji do sztucznych soków trawiennych symulujących warunki panujące w organizmie człowieka. Kwestia ta jest niezwykle istotna, gdyż pozwala określić rzeczywistą biodostępność Zn, Se i Cu w preparatach grzybowych wzbogacanych solami tych pierwiastków. Szczególnie istotna wydaje mi się informacja, że biomasa z kultur *in vitro* wzbogacona w Cu, Zn i Se „stanowi źródło biopierwiastków zapewniające podaż na poziomie dziennego zapotrzebowania człowieka”. Jedynie niejasny w tym podrozdziale wydaje mi się opis pod Tabelą 9 – czy porównywano zawartości rzeczywiście w wierszu pomiędzy pierwiastkami Mg i Zn dla soku żołądkowego i jelitowego.

W kolejnych podrozdziałach Doktorantka omawia wyniki zawartości związków indolowych, fenolowych oraz fenyloalaniny w wybranych gatunkach grzybów jadalnych oraz po ekstrakcji do sztucznych soków trawiennych. Przedstawienie niektórych wyników (Ryc. 12) w formie wykresu jest całkowicie nieczytelne ze względu na zastosowaną skalę, która jest nieadekwatna do zawartości niektórych związków np. melatonina (1,04 mg/100 g s.m.) i całkowita zawartość związków fenolowych (> 500 mg/100 g s.m.). Ponadto wykres zawiera wielokropki zamiast nazwy oznaczenia. Brak jest również tzw. „italica” dla nazwy gatunków

grzybów. Na kolejnych rycinach (13-16) nie zastosowano indeksu dolnego w przypadku wzorów soli. Ponadto z opisu pod tabelami 9 i 10 trudno wywnioskować, pomiędzy którymi parametrami wystąpiły istotne statystycznie różnice

Ostatni podrozdział 6.3. „Oznaczanie aktywności oksydacyjnej” napisany jest bardzo syntetycznie, a nawet lakonicznie i zabrakło w nim prezentacji wyników oraz dyskusji.

Rozdział VII Podsumowanie i wnioski stanowi zgrabny opis najważniejszych wyników uzyskanych w poszczególnych doświadczeniach. Czyta się go z wielką uwagą, gdyż w sposób syntetyczny i trafny podsumowuje ogrom pracy włożony w przygotowanie materiału do badań oraz wykonanie poszczególnych analiz. Doktorantka wskazuje również na konieczność dalszych badań nad oceną wpływu preparatów grzybowo-selenowych w odpowiedzi immunologicznej cieląt. Na podstawie uzyskanych wyników Pani mgr Włodarczyk wskazuje również na możliwość zastosowania rozwiązań biotechnologicznych w celu uzyskania np. suplementów diety z analizowanych grzybów leczniczych. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań wskazują na możliwość fortyfikacji wybranymi biopierwiastkami niektórych gatunków grzybów w celu uzupełniania niedoborów tych mikroelementów w organizmie człowieka. Ponadto zawarte w opisie konkluzje moim zdaniem wzbogacają tę część dysertacji i stanowią istotne wnioski z przeprowadzonych badań. Natomiast niektóre podpunkty stanowiące Wnioski wydają mi się raczej wynikami (obserwacjami) uzyskanymi podczas przeprowadzania poszczególnych doświadczeń.

Przestawiona do recenzji rozprawa doktorska jest kompletna i stanowi spójną całość, która umożliwiła Doktorantce realizację postawionych celów. Niejasne dla mnie kwestie (zamieszczone poniżej w formie zbiorczej), o których wspominałam w recenzji, nie umniejszają jakości dysertacji. Proszę Panią mgr Annę Włodarczyk o wyjaśnienie następujących zagadnień:

1. Doktorantka napisała, że do badań wybrano najpopularniejsze grzyby jadalne. Proszę o rozbudowanie tego wątku, gdyż w Polsce najpopularniejszymi grzybami uprawnymi są pieczarka dwuzarodnikowa oraz bocznik ostrogowaty.
2. Proszę o wyjaśnienie kwestii jednostki dziennej dawki zapotrzebowania na Se (60 µg/g, µg na g czego?)
3. Proszę o wyjaśnienie opisów zamieszczonych pod tabelami 7, 8, 9, 10, 11.
4. Proszę o wyjaśnienie sformułowania „skumulowane właściwości grzybni” ze strony 71 oraz „sama grzybnia *L. endodes* nie działała” ze strony 73.
5. Na stronie 74 zostało zamieszczone zdanie „Obecnie trwają badania naukowe nad opracowaniem precyzyjnej dawki i formy selenu, którą można podawać cielętom”. Czy

mogłaby Pani podać więcej szczegółów na temat tych badań – czy są to Pani badania, jakie formy selenu są brane pod uwagę itp.?


6. Wyniki, których badań były podstawą do sformułowania wniosku przedostatniego: „*P. djamor*, *P. citrinopileatus* i *P. pulmonarius* są alternatywą dla mięsa zwierzęcego w diecie człowieka, ze względu na zawartość aminokwasów egzogennych”.

### **Podsumowanie**

Pozytywnie oceniam przedstawioną mi do recenzji dysertację i stwierdzam, że Pani mgr Anna Włodarczyk zasługuje na nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Doktorantka wykazała się dojrzałym podejściem do obranego celu pracy poprzez zaprojektowanie i przeprowadzenie wielu doświadczeń zarówno na owocnikach jak i kulturach grzybów. Szerokie podejście do zagadnienia cytotoksyczności preparatów grzybowych wzbogacanych solami biopierwiastków, ocena biodostępności tych mikroelementów w warunkach imitujących procesy trawienne w organizmie człowieka, czy też ocena dobrostanu zwierząt żywionych preparatami grzybowo-selenowymi stanowi cenne źródło wiedzy na temat ich dalszego wykorzystania w żywieniu zarówno zwierząt jak i w diecie człowieka.

Ponadto o dojrzałości naukowej Pani mgr Anna Włodarczyk świadczy fakt, że jest współautorką 13 publikacji naukowych i jednego rozdziału w książce oraz 24 materiałów konferencyjnych, a łączny impact factor całego dorobku naukowego wynosi 40,842, co stanowi 911 punktów MNiSW.

Stwierdzam, że przedłożona mi rozprawa doktorska Pani mgr Anny Włodarczyk pt: „Potencjał biologiczny wybranych grzybów uprawnych w profilaktyce chorób cywilizacyjnych” spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wniosuję do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Anny Włodarczyk do dalszych procedur przewodu doktorskiego.

  
Prof. UPP, dr hab. Monika Gąsecka