

Dr hab. Anna Krzepińska prof. uczelni

06 sierpnia 2019

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywności Człowieka

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Wojciechowskiej pt.:” Wybrane terpenoidy jako modulatory homeostazy redoks oraz oporności wielolekowej w modelowych układach komórkowych *in vitro*”.**

Praca powstała w Katedrze Biofizyki Molekularnej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Pracę doktorską wykonano pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Grzegorza Bartosza i promotora pomocniczego dr Agnieszki Grzelak.

**Ocena merytoryczna pracy doktorskiej**

Białka oporności wielolekowej zmieniają dystrybucję ksenobiotyków w organizmie. Ich zwiększona ekspresja jest odpowiedzialna za występowanie zjawiska niewrażliwości na farmakoterapię patogennych mikroorganizmów jak również komórek nowotworowych. Coraz powszechniejsze występowania zjawiska oporności wielolekowej (MDR) zarówno w leczeniu grzybic jak i w chorobach nowotworowych w pełni uzasadnia podjęcie badań nad metodami, które umożliwiłyby zwiększenie wrażliwości komórek na leki. Grzybice systemowe są częstym powikłaniem w leczeniu chorób nowotworowych. Zarówno patogenne grzyby jak i komórki nowotworowe nabywają odporność na aktualnie stosowane leki. U *C. albicans* kluczową rolę odgrywają białka transportujące CDR1 i CDR2 należące do rodziny ABC. Również w przypadku komórek nowotworowych aktywność transporterowa białek ABC jest kluczowa dla MDR. U obu organizmów modelowych sposobem na przezwycięzenie MDR może być zastosowanie inhibitorów tych białek. Skutecznym inhibitorem białek ABC mogą być związki pochodzenia roślinnego takie jak terpenoidy. Mechanizm działania terpenoidów może także obejmować indukowanie stresu oksydacyjnego w komórkach i w konsekwencji ograniczać ich przeżywanie.

W przedłożonej rozprawie doktorskiej Autorka podejmując istotny klinicznie temat badań nad MDR powiązała kluczowe problemy dla chorób grzybiczych wywołanych przez *Candida albicans* i chorób nowotworowych: a mianowicie aktywność biobójczą testowanych związków wyjaśnia w kontekście oporności wielolekowej i funkcjonowania wybranych elementów systemu antyoksydacyjnego komórek.

Przegląd literatury wprowadza czytelnika w obszerną tematykę oraz część eksperymentalną pracy. Wnikliwe studia literaturowe świadczą o znajomości tematu badań.

Jednak we wstępie, moim zdaniem, zbyt mało uwagi poświęcono charakterystyce białek CDR *Candida albicans* należącym do rodziny ABC, których rola w odporności wielolekowej jest dobrze w literaturze opisana. Należy podkreślić trafny wybór organizmów modelowych: opornego na wybrane leki azolowe szczepu *C. albicans* MYA-574 i wrażliwego na te leki *C. albicans* 10231, jak i ludzkich linii komórkowych HepG2 raka wątroby i SW620 gruczolakoraka jelita grubego i pochodzących z niej linii SW620 D i SW620 V o zmienionej wrażliwości na doksorubicynę (D) lub winkrystynę (V) a także linii komórkowej nowotworu nerki psiej MDCKII i MDCKII MDR (stabilnego transfektanta z nadekspresją białka ABCB1). MDR jest zjawiskiem uzależnionym od licznej grupy czynników, a możliwe sposoby jej zniesienia dotyczą wielu aspektów biologii komórki, w tym zmiany ekspresji genów kodujących białka transporterowe i zmiany odpowiedzi ze strony systemu antyoksydacyjnego komórki na wprowadzane do ustroju leki. Autorka dobrze zrozumiała te zależności, zarówno analizując problem w przeglądzie literatury jak i projektując doświadczenia. Doktorantka stosowała różne podejścia eksperymentalne i stosowała adekwatne metody badawcze. W związku z tym najpierw podjęła badania nad cytotoksycznym oddziaływaniem terpenoidów na *C. albicans*: wyznaczyła stężenie terpenoidów hamujące wzrost populacji komórek w 50%, wyznaczyła minimalne stężenia hamujące, badała wpływ czasu inkubacji z wybranymi terpenoidami na przeżywalność komórek, określiła czas podwojenia liczby komórek w populacji dla szczepu *C. albicans* MYA-574. Mając na uwadze zjawisko MDR Doktorantka oceniła także wpływ terpenoidów na poziom ekspresji *cdr1* i *cdr2* mRNA i aktywność białek transporterowych. Określiła wpływ leków azolowych na aktywność wybranych enzymów antyoksydacyjnych u *C. albicans*. Następnie w komórkach szczepu opornego na leki azolowe *C. albicans* MYA-574 Autorka oceniła interakcje pomiędzy terpenoidami a lekami azolowymi poprzez oznaczenie czasu podwojenia liczby komórek w populacji, określiła zmiany poziomu RFT i zawartość glutationu.

Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę dotyczącą mechanizmu odporności wielolekowej u *C. albicans*. Doktorantka wskazała cytral, geraniol i borneol jako związki o największej aktywności przeciwgrzybiczej względem badanych komórek *C. albicans*. Mgr Dominika Wojciechowska udowodniła, że spośród jedenastu badanych związków wszystkie hamowały aktywność białek transporterowych CDR1 i CDR2, a sześć z nich zmniejszało poziom ekspresji genów *cdr1* i *cdr2*. Badane terpenoidy wydłużały czas podwojenia populacji komórek *C. albicans* MYA-574, a kilka z nich stosowane łącznie z lekami azolowymi zwiększały działanie leków azolowych w tym teście, największe synergiczne działanie zaobserwowano dla triwertalu i itrakonazolu, flukonazolu i mikonazolu. Doktorantka potwierdziła, że zarówno

terpenoidy (za wyjątkiem geraniolu, bornelu i ketonu metyloowo-cedrylowego) jak i leki azolowe powodują zwiększenie poziomu RFT w komórkach *C. albicans* MYA-574, a ich wspólne działanie na komórki dawało w większości przypadków efekt synergiczny. Terpenoidy u *C. albicans* mogą wpływać na funkcje białek CDR i dzięki temu wspomagać leczenie grzybicy i wspierać chemioterapię nowotworów. Do ważnych osiągnięć Doktorantki zaliczam wskazanie które z terpenoidów i leków azolowych mają synergiczne działanie w przeprowadzonych doświadczeniach.

Podobne wieloaspektowe podejście badawcze zastosowała dla komórek linii HepG2, SW620, i MDCKII: wyznaczyła stężenie terpenoidów hamujące wzrost populacji komórek w 50%, a następnie dla najsilniej działającego ketonu metyloowo-cedrylowego aktywność białek transporterowych, oceniła czy jego efekt cytotoksyczny był związany z zaburzeniami funkcjonowania błony komórkowej poprzez pomiar dyfuzji lateralnej pirenu a także przepuszczalność błony komórkowej. Zbadala także wpływ wybranych terpenoidów na ekspresję genów związanych z odpowiedzią komórek nowotworowych na stres oksydacyjny.

Dużą wartość poznawczą mają wyniki dotyczące badanych linii komórek nowotworowych. Doktorantka wykazała, że komórki linii nowotworowych charakteryzują się zróżnicowaną przeżywalnością względem terpenoidów. Związki te modulują poziom ekspresji genów związanych z odpowiedzią komórek na stres oksydacyjny. Wskazała na keton metyloowo-cedrylowy jako związek o największym potencjale terapeutycznym, gdyż był cytotoksyczny, wpływał na aktywność białka ABCB1 i zmieniał funkcjonowanie błony komórkowej badanych linii nowotworowych.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania dostarczają nowatorskich i cennych informacji o oddziaływaniu terpenoidów na ważne dla poznania mechanizmów odporności wielolekowej organizmy modelowe: *C. albicans* i badane linie komórek nowotworowych. Uzyskane wyniki mają potencjał aplikacyjny. Doktorantka stwierdziła, że badane terpenoidy mogą zwiększać działanie leków azolowych, co może poprawić skuteczność leczenia grzybic. Równocześnie badane terpenoidy poprzez hamowanie białek ABC i modulowanie odpowiedzi na stres oksydacyjny w komórkach nowotworowych mogą poprawiać skuteczność chemioterapii.

### **Ocena formalna pracy**

Przedstawiona praca ma typowy układ treści, koncepcja i układ rozprawy doktorskiej są uzasadnione tematyką przeprowadzonych badań. Praca zawiera wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, literaturę i suplement. Łącznie opracowanie liczy 114 stron, zawiera 17 tabel i 17 rycin. W większości

rozdziałów wydzielono merytorycznie uzasadnione podrozdziały. Praca napisana jest specjalistycznym, naukowym językiem. W części literaturowej Autorka powołuje się trafnie na źródła literaturowe związane tematycznie z opisywanym problemem badawczym. Autorka formuje cele pracy i opisowo przedstawia również cele szczegółowe. Wymienione cele znajdują wyraz w treści pracy, gdzie Doktorantka bierze pod uwagę różne elementy i aspekty badanych zjawisk i procesów. Metodyka badań jest zróżnicowana i została poprawnie dobrana do realizowanego zadania badawczego. Przedstawiona praca doktorska wskazuje na umiejętność Doktorantki do prowadzenia badań zarówno na etapie planowania, wykonania doświadczeń i analiz laboratoryjnych jak i opracowania wyników. Wyniki z reguły są przedstawione czytelne w tabelach i na rycinach. W opisie wyników podano podstawowe informacje dotyczące liczby prób i obliczeń statystycznych. W celu zwiększenia przejrzystości danych Autorka umieściła część wyników w załączniku. Dyskusja jest rzeczowa i merytoryczna. Autorka przeprowadziła polemikę dotyczącą uzyskanych wyników z osiągnięciami innych autorów. Wnioski końcowe korelują z wyznaczonymi celami badawczymi. Bibliografia jest zazwyczaj poprawnie przedstawiona i cytowana, obejmuje 190 pozycji literatury.

Generalnie praca jest przygotowana starannie, jednak Autorka nie uniknęła błędów edycyjnych i formalnych.

- Wstęp poprzedza wykaz skrótów stosowanych w pracy, który powinny być przedstawione w kolejności alfabetycznej.
- Język pracy jest zasadniczo poprawny, jednak w tekście występują wyrażenia żargonowe (s. 36, 54 czas podwojenia hodowli zamiast czas podwojenia populacji komórek w hodowli), używane jest słowo bójczy (s. 42, 43), które w słowniku języka polskiego występuje w formie złożzeń np. grzybobójczy, nigdy samodzielnie. Używanie słowa szacować dla określenia aktywności enzymu (s.34, 35,) sugeruje niezbyt dokładne oznaczenia. W kilku miejscach w pracy Autorka podaje skrócone, uproszczone informacje (s.4 ...szlak glikolizy tlenowej..., dostarczają (...) wysokoenergetycznych związków - mleczanu, ketonów...), co prowadzi do nieporozumień.
- Autorka nie podaje nazw chemicznych stosowanych związków zaliczanych do terpenoidów, wykorzystanych w doświadczeniach. Nie podaje też nazw chemicznych i źródła pochodzenia związków wykorzystywanych jako leki azolowe. W pracy pojawiają się też błędne nazwy związków chemicznych (s.28 jest worzkonazol zamiast worykonazol). Na jakiej podstawie zaliczono kwas kawowy do terpenoidów?

-W opisie metodyki pojawiają się nieścisłości. W rozdziale III.10 napisano, że doświadczenie prowadzono 24h zaś na ryc. 13 mamy zmiany OD hodowli po 2 dobach wzrostu. W opisie metodyki III.4, III.5, III.6, III.7, III.8 brakuje informacji na jakim szczepie *Candida albicans* przeprowadzono doświadczenie. W przypadku kilku metod nie podano źródeł literaturowych np. III.12, III.17.

- Autorka nie zdefiniowała jednostki aktywności dla oznaczanych enzymów: S-transferazy glutationowej, reduktazy glutationowej, katalazy. Skrót jednostki zwyczajowo pisany jest dużą literą [U]. Proszę także wyjaśnić różnice w oznaczeniu osi OY na rycinie 15.

- Przy powoływaniu się na wyniki badań w rozdziale Dyskusja należało podać numery tabel i rycin.

Powyższe uwagi nie wpływają na merytoryczną ocenę pracy, są sugestiami pomocnymi w ewentualnej dalszej pracy badawczej i mogą być pomocne przy przygotowywaniu publikacji naukowej na podstawie prezentowanego doktoratu.

### **Podsumowanie**

Zaprezentowana rozprawa doktorska dostarcza wielu wartościowych i oryginalnych informacji oraz wzbogaca wiedzę o mechanizmie działania terpenoidów na komórki *C. albicans* i badane linie komórek nowotworowych. Pozytywnie oceniam merytoryczną i formalną stronę rozprawy doktorskiej. Ważność poruszanego problemu badawczego, oryginalna koncepcja przedstawionych badań, poprawnie przeprowadzone doświadczenia wymagające opanowania różnych metod badawczych, uzyskanie oryginalnych wyników wskazujących na potwierdzenie stawianych celów naukowych, merytoryczna interpretacja faktów naukowych świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez mgr Dominikę Wojciechowską. Stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca „Wybrane terpenoidy jako modulatory homeostazy redoks oraz oporności wielolekowej w modelowych układach komórkowych *in vitro*” autorstwa mgr Dominiki Wojciechowskiej spełnia wszystkie ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Wniosuję do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Dominiki Wojciechowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Kopytko