



Prof. dr hab. Michał Żmijewski,
Katedra Histologii,
Gdański Uniwersytet Medyczny,
ul. Dębinki 1a, Pokój 15
80-210 Gdańsk, Pomorskie
Polska
Tel: +48 583491455
Email: mzmijewski@gumed.edu.pl

Gdańsk, 04.08.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Dominiki Wojciechowskiej

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej **Pani Dominiki Wojciechowskiej** jest: „**Wybrane terpenoidy jako modulatory homeostazy redoks oraz oporności wielolekowej w modelowych układach komórkowych *in vitro***”.

Promotor pracy: **Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz**, Katedra Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki.

Promotor pomocniczy pracy: **dr Agnieszka Grzelak**, Katedra Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki.

1) Ocena merytoryczna

a) trafność podjętej tematyki i jej oryginalność.

Infekcje grzybicze oraz odporność wielolekowa stanowi duże wyzwanie dla współczesnej medycyny. Pomimo włączania kolejnych generacji leków przeciwgrzybiczy, wciąż pojawiają się szczepy odporne, które stanowią szczególnie trudny cel terapeutyczny. Odporność wielolekowa jest nie tylko domeną mikroorganizmów, ale również komórek nowotworowych. Odporność komórek nowotworowych jest główną przyczyną niepowodzenia terapii lub wznowy choroby nowotworowej, co z kolei może prowadzić do śmierci pacjenta.

Środowisko naturalne od tysiącleci stanowi ważne źródło leków, a współczesna nauka umożliwia nam identyfikację i izolację substancji biologicznie aktywnych zawartych w organizmach żywych oraz materii nieorganicznej. Szczególną grupą tych naturalnych związków są terpeny i terpenoidy, związki powszechnie występujące w zarówno w roślinach, owadach, drobnoustrojach, jak i organizmach morskich. Z uwagi na specyficzne walory fizykochemiczne, takie jak: kolor, smak i zapach, związki te powszechnie wykorzystywane są w przemyśle spożywczym i kosmetycznym. Co ciekawe, wiele z nich wykazuje również właściwości lecznicze.

Tak, więc rozprawa doktorska mgr **Dominiki Wojciechowskiej** dotycząca **badania aktywności biologicznej wybranych terpenów w komórkach drożdży oraz komórkach linii nowotworowych** świetnie wpisuje się w nurt najnowszych badań i wychodzi naprzeciw wyzwaniom współczesnej medycyny.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska przygotowana zastała w formie monografia, w tak zwanym „starym trybem” (Rozporządzeniem MNiSW z dnia 22 września 2011 r., będącym nowelizacją art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki). Manuskrypt zawiera, 112 stron maszynopisu, w tym: 17 rycin i 17 tabel, z tym, że tabel 13-17 umieszczone zostały w suplementie. Niestety nie udało mi się znaleźć informacji, czy przedstawione wyniki, choć częściowo zostały opublikowane, a z pewnością są warte szerszej prezentacji w dobrych czasopismach.

b) ocena uzyskanych rezultatów

Rozprawa doktorska Pani mgr Dominiki Wojciechowskiej opiera się na dwóch modelach badawczych. Pierwszy to komórki drożdżowe (szczyepy *Candida albicans*) drugie to linie nowotworowe. Doktorantka badała wpływ wybranych terpenoidów na wzrost szczepów drożdżowych lub komórek linii nowotworowych, poziom reaktywnych form tlenu (RTF), aktywację odpowiedzi na RTF, ekspresję genów związanych z produkcją oraz odpowiedzią na RTF oraz aktywności i ekspresji białek związanych z odpornością wielolekową (transporterów białkowych). Dodatkowym i bardzo istotnym celem pracy było zbadanie, czy wybrane terpenoidy wspomagają działanie klasycznych związków grzybobójczych na modelu komórek drożdżowych, i analogicznie związków wykorzystywanych w terapii nowotworowej na wybranych linii nowotworowych. Należy podkreślić bardzo przemyślany wybór szczepów drożdżowych oraz linii komórkowych, wśród których były szczepy lub linie odpowiednio: wrażliwe albo odporne na klasyczne leki. Dzięki temu doktorantka zbadala nie tylko współdziałanie terpenoidy z lekami, ale również wykazała, że w niektórych przypadkach terpenoidy uwrażliwiają komórki odporne.

Wśród najistotniejszych wniosków wynikających z przedstawionych badań na komórkach drożdżowych, należy wymienić:

- Wykazanie, że wśród badanych związków cytral, geraniol i borneol wykazywały najsilniejsze własności przeciwgrzybicze, chociaż należy dodać, że wszystkie badane związki hamowały wzrost *C. albicans* i wydłużały czas podwojenia populacji. W tych badaniach najskuteczniejsze były kamfora i mentol.
- Wykazanie, że szereg badanych związków, ale nie cytral obniżał poziom mRNA dla białek CDR1 i CDR2 odpowiedzialnych za usuwanie leków antygrzybiczych z komórek. Wynik ten sugeruje, że inny mechanizm jest odpowiedzialny za wysoką aktywność cytralu.
- Wykazanie, w szeregu testów, synergistycznego działanie terpenoidów z lekami grzybobójczymi. Największe działanie synergistyczne wykazywały np. triwertal z lekami azolowymi w teście podwojenia populacji *C. albicans*, czy mentol z mikonazolem w badaniach generacji RTF w komórkach *C. albicans*.

Jeśli chodzi o badania na liniach komórkowych pochodzących z nowotworów to do najważniejszych osiągnięć doktorantki należy wymienić:

- Wykazanie, że większość badanych terpenoidów wykazywało własności cytotoksyczne
- Wykazanie, że keton metylowo-cydrylowy wpływa na aktywność transportera ABCB1, zwiększał płynność oraz przepuszczalność błony komórkowej, co teoretycznie sprzyja wnikananiu leków do komórek.

Dodatkowo doktorantka wykazała, że badane terpenoidy modulując ekspresję genów związanych z produkcją lub odpowiedzią na RFT.

Podsumowują, badane terpenoidy mogą znaleźć zastosowanie w terapii skojarzonej z lekami przeciwgrzybiczymi lub w hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych. Co ciekawe, **mgr Wojciechowska**, zwróciła również uwagę na potencjalną skuteczność wybranych terpenoidów w leczeniu chorób grzybiczych towarzyszących często nowotworom. W tym wypadku terpenoidy były by skuteczne zarówno wobec komórek drożdżowych, jak i nowotworowych.

c) poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna.

W tym miejscu, chciałbym zwrócić szczególnie uwagę na to, że doktorantka świetnie operuje terminologią chemiczną, jak również przejrzysto i czytelnie opisuje zarówno bardzo skomplikowaną i rozbudowaną metodykę, jak i wyniki i dyskusje.

Z uwagi na funkcję recenzenta muszę zwrócić uwagę na drobne błędy, które jednak pojawiły się w pracy:

- Tytuł rozdziału IV.1 (i w innych miejscach również) sugeruje oznaczenia „stężenia bójczego” może lepiej grzybobójczego.
- w bardzo obszernej liście skrótów trochę brakuje konsekwencji, albo podana jest nazwa angielska, potem polska; albo jest tylko polska; albo tylko angielska. Wydaje mi się, że warto byłoby to usystematyzować.
- Strona 53, trzecia linijka od dołu. „Terpenoidami” (literówka)
- Strona 75, środkowy akapit. Wydaje mi się, że w reakcji qPCR nie dochodzi do „namnażania produktu” a raczej amplifikacji. Tak mi się również wydaje, że opis qPCR raczej pasuje do rozdziału Metody, niż do Dyskusji.

Chciałbym podkreślić, że niewielki błędy, które wymieniłem, nie wpływają na ogólną ocenę pracy i są zrozumiałe w przypadku tak obszernego opracowania (ponad 100 stron).

2) Ocena metodologiczna

a) dobór literatury, umiejętności, wykorzystania źródeł

Praca mgr Dominiki Wojciechowskiej zawiera 190 **bardzo dobrze** dobranych odnośników literaturowych. Szkoda tylko, że prace najnowsze (z ostatnich 3 lat) stanowią tylko niewielką część cytowanej literatury (mniej niż 20%).

b) poprawność formułowania problemów i hipotez (założeń badawczych).

Podjęta tematyka włącza się bardzo dobrze w nurt światowych badań nad zastosowaniem naturalnych substancji biologicznie czynnych w terapii chorób grzybiczych oraz nowotworów. Problem badawczy został sformułowany poprawnie w postaci dwóch głównych punktów dotyczących badań aktywności terpenoidów, jako substancji grzybobójczych lub przeciwnowotworowych. Szczegółowe punkty odnoszą się do systematycznego badania mechanizmów wykorzystywanych przez te związki w hamowaniu wzrostu komórek, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów działania oraz współdziałania z klasycznymi lekami grzybobójczymi lub przeciwnowotworowymi.

W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na ogromną różnorodność oraz ilość przeprowadzonych badań. Biorąc pod uwagę, że doktorantka wykorzystwała dwa różne modele badawcze, wydaje się, że zgromadzone wyniki badań po odpowiednim opracowaniu z pewnością stanowiłyby podstawę nawet dwóch rozpraw doktorskich.

c) trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania.

Autorka wykorzystwała szeroki wachlarz metody biologii molekularnej, zarówno klasycznych, jak wyznaczenie IC50, qPCR, czy badanie aktywności enzymatycznej, jak również bardziej skomplikowanej metodologii, w tym unikatowych testów opracowanych lub zmodyfikowanych w laboratorium prof. Bartosza. Bardzo przydany jest szczegółowy opis wykonania każdego doświadczenia, który z pewnością może być wykorzystany w każdym laboratorium. **Warto, w tym miejscu podkreślić ogromną ilość wykonanych oznaczeń, ich dobre zaplanowanie, oraz przejrzyste przedstawienie.**

Z uwagi na funkcję recenzenta mam kilka pytań dotyczących metodologii oraz prezentowania danych.

- Strona 29, Linia 9, jakie było maksymalne stężenie etanolu w trakcie badań?
- Strona 40, punkt III.19, zawiera bardzo dokładny opis reakcji qPCR, natomiast brakuje sekwencji primerów (więcej uwag poniżej).
- Ryciny 2-12. Dlaczego dla kontroli na żadnym z wykresów nie zaznaczono słupka SEM? Z mojego wieloletniego doświadczenia mogę powiedzieć, że rzadko wychodzi tak idealnie.
- Ryciny 2-12. Czy na wszystkich grafach zaznaczono wszystkie wartości istotne statystycznie np. dla cytralu (Ryc 8) albo fernezolu (Ryc 10) w stężeniach 1000 μM ?
- Tabele 5,6,7,8,9,10,11. Brak podanej istotności statystycznej uzyskanych wyników. Niektóre legendy do tabel zawierają nawet informację dotyczące istotności statystycznej, ale nie zostało to zaznaczone w tabelach. Warto pomyśleć o dobrym i czytelnym sposobie zaznaczania istotności statystycznej przed publikacją
- Tabela 9. Brak jednostki, w jaki sposób mierzona była generacja RTF?
- Tabela 12. Gratuluje wykonania ogromnej liczby oznaczeń qPCR. Chciałby się jednak upewnić, czy oznaczenia te były wykonane osobno dla każdego genu, czy korzystano z jakiegoś zestawu czy mikromacierzy? W suplemencie (Rozdział X) znajdują się wyniki liczbowe dla qPCR. Ilorotnie wykonano oznaczenia? W każdej z tabel w tym rozdziale pokazano SEM, który wykazuje brak jakiegokolwiek rozbieżności między powtórzeniami, co raczej wskazuje, że oznaczenia wykonano w jednym powtórzeniu, jeśli tak to po co zaznaczać SEM?

Na zakończenie chciałbym podkreślić, że **bardzo wysoko oceniam warsztat badawczy Pani mgr Dominiki Wojciechowskiej**. Świadczy o tym, wielokierunkowa analiza wpływ szeregu badanych związków, dwa modele badawcze (drożdże, komórki nowotworowe) oraz wykorzystanie odpowiednio szczepów lub linii wrażliwych lub odpornych na klasyczne leki.

d) poprawność układu pracy i struktury podziału treści.

Praca ma klasyczny układ, zawiera dokładny spis treści, drobiazgowy spis skrótów, bardzo obszerny wstęp systematycznie i drobiazgowo wprowadzającego czytelnika w świat

terpenoidów i nośników białkowych. Następnie, praca zawiera wypunktowane cele pracy, obszerny rozdział dotyczący materiałów i metod, później rozdział rezultaty oraz dyskusję. Należy podkreślić znaczną ilość cytowanej literatury (190 pozycji). Manuskrypt nie zawiera niestety, spis rycin i tabel, chociaż nie jest ich zbyt wiele. Dodatkowo manuskrypt zawiera suplement, w którym zamieszczone są wyniki analizy ekspresji genów związanych z RFT w różnych liniach nowotworów.

Praca jest przejrzysta, a rysunki, tabele oraz wykresy świetnie ją ilustrują. Szkoda tylko, że nie udało się doktorantce zachować jednego formatu wykresów pod względem kolorystyki i stylistyki. Na pewno przydałby się jeden – dwa rysunki ogólne. Pierwszy schemat ze strukturą badanych terpenoidów. Drugi rysunek i/a tabel mógłby zawierać graficzne i/lub tabelaryczne podsumowanie wyników.

Wydaje mi się, w układzie pracy warto było jednak wydzielić 2 części: „drożdżową” i „nowotworową”. Czasami w pracy przejście między jednym a drugim modelem jest dość płynne (np. w dyskusji), co może wprowadzić w błąd nieuwważnego czytelnika. Zdaje sobie sprawę, że autorka chciała w ten sposób podkreślić spójność tematyki, ale z drugiej strony troszeczkę brakuje w wynikach i dyskusji uwypuklenia wartości uzyskanych wyników w kontekście zastosowania terpenoidów w terapii antygrzybiczej i oddzielnie antynowotworowej. Na przykład, który ze związków byłby najodpowiedniejszy i dlaczego? Co więcej jeden z najciekawszych wniosków zasługujący na szczególne podkreślenie, zawarty jest w krótką wzmiance na stronie 79. Otóż, uzyskane przez doktorantkę wyniki wskazuje, że **badane związki mogłyby jednocześnie zwalczać grzybice systemowe i wspierać chemioterapię**. I znowu rodzi się pytanie, który z badanych terpenoidów byłby najefektywniejszy i dlaczego? Jeszcze jedna sugestia, wydaje mi się, że w Dyskusji zbyt mało doktorantka nastawiła się na omawianie kolejnych wyników, a mniej miejsca poświęciła na analizę wyników w odniesieniu do badań innych zespołów. Powyższe sugestie, w żadnej mierze nie umniejszają dokonań doktorantki oraz wartości poznawczej, a raczej są zachętą do dalszej analizy uzyskanych danych oraz dyskusji w czasie publicznej obrony.

3) wnioski końcowe (konkluzja).

Podsumowując, monografia Dominiki Wojciechowskiej oparta jest o imponującą serię doświadczeń, wyniki są dobrze opisane i zilustrowane, a dyskusja systematycznie omawia uzyskane wyniki. Szkoda tylko, że wyniki tak obszernych i ważnych badań nie doczekał się jeszcze publikacji. Natomiast z drugiej strony, mam nadzieję, że moje drobne uwagi zadziałają stymulująco i przyczynią się powstania bardzo dobrych artykułów. Uważam, więc że przedstawiana do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, dlatego też pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, wniosek o dopuszczenie Pani Dominiki Wojciechowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Michał Żmijewski

Katedra Zakład Histologii
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, dnia 04.08.2019

Prof. dr hab. Michał Żmijewski