

Dr hab. Małgorzata Dobrzyńska, prof. NIZP PZH – PIB
Zakład Higieny Radiacyjnej i Radiobiologii
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – PIB
ul. Chocimska 24
00-791 Warszawa

Warszawa, 9.10.2022 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Magdaleny Kluski

**pt. „Kempferol i jego pochodne jako związki modulujące aktywność
przeciwnowotworową etopozydu”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej Instytutu Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego. Promotorem pracy jest Pani Prof. dr hab. Katarzyna Woźniak, a promotorem pomocniczym Pani dr Justyna Krzyżanowska-Kowalczyk.

Terapia chorób nowotworowych należy do najtrudniejszych wyzwań stojących przed współczesną medycyną. Stosowanie tradycyjnych metod leczenia nowotworów wiąże się z występowaniem wielu skutków ubocznych. Ponadto, komórki nowotworowe mogą być odporne na stosowane leczenie. Dlatego niezwykle ważne jest poszukiwanie nowych i efektywnych związków pomocnych w leczeniu, jak również opracowanie innowacyjnych metod terapii. Poszukiwane związki powinny charakteryzować się aktywnością przeciwnowotworową oraz jak największą skutecznością, a jednocześnie nie powodować skutków ubocznych ani nie wykazywać działania toksycznego stosunku do komórek prawidłowych.

Doktorantka postawiła sobie za cel ocenę wpływu kempferolu oraz jego glikozydowych pochodnych wyizolowanych z nadziemnych części soczewicy *Lens culinaris* Medik na przeciwnowotworowe działanie etopozydu. Jako cele szczegółowe Doktorantka określiła ocenę cytotoksyczności i genotoksyczności w komórkach nowotworowych i prawidłowych, określenie rozkładu komórek nowotworowych w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, ocenę wpływu badanych związków na proces apoptozy w komórkach nowotworowych, ocenę potencjału antyoksydacyjnego komórek oraz analizę zmian profilu

ekspresji genów kodujących enzymy odpowiedzialne za odpowiedź antyoksydacyjną komórek. W mojej ocenie zarówno cel główny, jak i cele szczegółowe są uzasadnione i jasno sprecyzowane.

Etopozyd jest półsyntetyczną pochodną podofilotoksyny, liganu izolowanego z korzeni i kłączy *Podophyllum peltatum* lub *Podophyllum emodi* (Barberidaceae). Stosowany jest on w leczeniu wielu nowotworów, takich jak rak płuca, jąder, białaczka, rak kory nadnerczy i guzy mózgu. Polifenole, które są obecne w wielu produktach roślinnych stanowiących składnik diety człowieka posiadają właściwości antyoksydacyjne, a niektóre z nich wykazują łagodne, znacznie mniejsze w porównaniu ze stosowanymi w standardowej terapii lekami, działanie antynowotworowe. Ponadto, związki te mogą modulować aktywność przeciwnowotworową chemioterapeutyków, zwiększając ich efektywność. Jednocześnie polifenole nie są toksyczne dla komórek prawidłowych i mogą chronić je przed szkodliwym działaniem chemioterapeutyków. Dlatego w ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowanie wykorzystaniem polifenoli w leczeniu nowotworów. Przedstawiona do recenzji praca doskonale wpisuje się więc w aktualny nurt badań nad innowacyjnymi metodami terapii nowotworów.

Postawą hipotezy badawczej przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej było założenie, że wybrane do badań związki polifenolowe (kempferol i jego pochodne) mogą zmieniać aktywność przeciwnowotworową etopozydu poprzez wpływ na żywotność komórek nowotworowych, na uszkodzenie ich DNA, na zmianę profilu redoks oraz modyfikację ekspresji genów NFE2L2, SOD1, SOD2, HMOX-1 i NQO2, odpowiadających za ochronę antyoksydacyjną w komórkach nowotworowych.

Na rozprawę doktorską mgr Magdaleny Kluski składa się cykl 4 prac opublikowanych w angielskojęzycznych czasopismach naukowych w latach 2019-2022 o łącznym 5-letnim IF wynoszącym 20,069, ocenionych zgodnie z punktacją MEiN na 460 pkt. We wszystkich tych publikacjach doktorantka jest pierwszym autorem, co świadczy o znacznym wkładzie pracy mgr Kluski podczas realizacji części doświadczalnej i powstawania manuskryptów. Udział ten został potwierdzony zamieszczonymi w rozprawie oświadczeniami współautorów. Cykl prac jest spójny tematycznie, poszczególne publikacje stanowią realizację założonego celu badawczego. Dodatkowo doktorantka zamieściła w dysertacji „Skrócony opis prowadzonych prac wraz z omówieniem wyników”, składający się podrozdziałów Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Opis wyników, Podsumowanie wyników, Literatura uzupełniająca, stanowiący niejako posumowanie informacji przedstawionych w składających się na dysertację publikacjach.

Układ rozprawy doktorskiej oceniam jako przejrzysty i dobrze napisany. Piśmiennictwo do każdej publikacji oraz piśmiennictwo uzupełniające zostało dobrane prawidłowo i zgodnie z bieżącym stanem wiedzy odnośnie przedstawionych tematów.

Pierwsza praca zatytułowana "Natural polyphenols as modulators of etoposide anti-cancer activity" opublikowana w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* jest publikacją przeglądową, która stanowi odpowiednik wstępu typowej dysertacji doktorskiej. W pracy szczegółowo opisano polifenole pochodzenia naturalnego oraz przedstawiono dane literaturowe na temat indukowanych przez nie modyfikacji aktywności etopozydu. Wnioski z tej publikacji stanowią przesłankę do sformułowania celu głównego niniejszej dysertacji.

Druga z kolei, a jednocześnie pierwsza publikacja doświadczalna pod tytułem "Kaempferol derivatives isolated from *Lens culinaris* Medik, reduce DNA damage induced by etoposide in peripheral blood mononuclear cells" opublikowana w *Toxicology Research* opisuje wpływ kempferolu, jego pochodnych glikozydowych, frakcji polifenolowej i ekstraktu wyizolowanego z nadziemnych części soczewicy na indukowane etopozydem uszkodzenia DNA. Do badań wykorzystano komórki nowotworowe ludzkiej białaczki promielocytowej HL-60 oraz prawidłowe komórki jednojądrzaste krwi (PBMC) izolowane z kożuszków leukocytarno-płytkowych pochodzących od zdrowych dawców. Nie stwierdzono działania cytotoksycznego badanych związków. Wykazano, że kempferol indukuje uszkodzenia DNA w komórkach HL-60 oraz zwiększa poziom uszkodzeń DNA indukowanych przez etopozyd w komórkach nowotworowych i prawidłowych. Badane pochodne kempferolu redukują ilość uszkodzeń DNA generowanych przez etopozyd w komórkach prawidłowych. Z kolei ekstrakt i frakcja polifenolowa indukują uszkodzenia DNA w komórkach prawidłowych oraz zwiększają poziom uszkodzeń indukowanych przez etopozyd w komórkach HL-60.

W drugiej z prac doświadczalnych zatytułowanej „Kaempferol and its glycoside derivatives as modulators of etoposide activity in HL-60 cells” opublikowanej w *International Journal of Molecular Sciences* opisano wpływ kempferolu i jego glikozydowych pochodnych na aktywność etopozydu w komórkach ludzkiej białaczki promielocytowej HL-60. Generalnie pochodne kempferolu nie wpływały na cytotoksyczność etopozydu ani na proces apoptozy indukowany przez etopozyd lub go obniżały. Nie stwierdzono wpływu kempferolu i jego pochodnych na przebieg cyklu komórkowego. Kempferol zmniejszał poziom reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach linii HL-60 oraz w komórkach inkubowanych z etopozydem. Jedna z pochodnych wykazywała podobne działanie, a dwie inne zwiększały poziom RFT.

W ostatniej z cyklu prac składających się na dysertację pt. „Effect of kaempferol and its glycoside derivatives on antioxidant status of HL-60 cells treated with etoposide” opublikowanej w czasopiśmie *Molecules* analizowano ekspresję 5 genów kodujących enzymy odpowiedzialne za obronę antyoksydacyjną komórek: NFE2L2, SOD1, SOD2, HMOX-1 i NQO1. Zbadano również aktywność enzymatyczną dysmutaz podtlenkowych (SOD) oraz poziom całkowitego wewnątrzkomórkowego glutationu. Wykazano, że żaden z badanych związków nie wpływał na poziom ekspresji genu NFE2L2. Kempferol zwiększał ekspresję pozostałych badanych genów działając samodzielnie oraz w komórkach inkubowanych z etopozidem, Natomiast działanie glikozydowych pochodnych kempferolu różniły się w zależności od dawki i badanych genów. Wszystkie badane pochodne zwiększały poziom ekspresji genu HQ1 w komórkach inkubowanych z etopozidem. Kempferol oraz dwie jego pochodne zwiększały także aktywność enzymatyczną SOD oraz zwiększały poziom glutationu w komórkach inkubowanych z etopozidem.

Rozprawa doktorska została przygotowana starannie. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością metod badawczych i prawidłowo je wykorzystwała w publikacjach składających się na dysertację, dzięki czemu zrealizowała cel badawczy. Doktorantka sprawnie posługuje się terminologią naukową. Uzyskane przez Autorkę wyniki zostały wnikliwie przeanalizowane i logicznie zinterpretowane, a następnie porównane z wynikami uzyskanymi w piśmiennictwie międzynarodowym, co świadczy o Jej dobrym przygotowaniu i dojrzałości naukowej. Przedstawiona do oceny dysertacja dowodzi wysokich kompetencji naukowych doktorantki i dobrej znajomości podjętej problematyki.

W moim odczuciu przedstawiona do oceny rozprawa stanowi istotny wkład w ogólną wiedzę na temat modyfikacji aktywności przeciwnowotworowej etopozydu przez polifenole pochodzenia naturalnego. Doktorantka pokazała, że posiada wiedzę w zakresie planowania zadań naukowych, posługiwania się metodami badawczymi prowadzącymi do zamierzonych celów, właściwej prezentacji wyników, krytycznej oceny wyników własnych badań i ich konfrontacji z danymi z piśmiennictwa. Autorka udowodniła, że jest w stanie opublikować wyniki badań w czasopismach naukowych o szerokim zasięgu. Jest zatem przygotowana do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała 6 logicznych wniosków, które znajdują potwierdzenie w wynikach przedstawionych badań. W ostatnim z nich, który stanowi jakby podsumowanie pozostałych, Autorka trafnie stwierdza, że obecność reszt kwasów fenolowych w cząsteczkach glikozydowych pochodnych kempferolu wpływa

prawdopodobnie na ich potencjał jako modulatorów działania przeciwnowotworowego etopozydu.

Z obowiązku recenzenta muszę przedstawić kilka uwag krytycznych dotyczących ocenianej dysertacji. Pracę mogłoby wzbogacić o dodatkową wyniki zastosowanie testu kometowego w wersji neutralnej, co pozwoliłoby na wykrycie indukcji przez etopozyd oraz ewentualnej modyfikacji częstości występowania podwójniniowych uszkodzeń DNA przez badane polifenole. Zabrakło mi też kilkudzaniowej dyskusji na temat potencjalnych możliwości zastosowania osiągniętych wyników w terapii nowotworów, co merytorycznie wzbogaciłoby pracę. Ponadto, zauważyłam kilka drobnych, mało istotnych błędów edytorskich.

Przedstawione przeze mnie uwagi nie umniejszają oczywiście wartości merytorycznej rozprawy, którą oceniam wysoko.

Analizując całokształt dorobku naukowego Doktorantki warto podkreślić dużą aktywność naukową mgr Magdaleny Kluski. Oprócz publikacji wchodzących w skład dysertacji opublikowała 2 publikacje przeglądowe oraz 7 publikacji doświadczalnych, co oznacza sumaryczny IF=61,637 i 1280 pkt MEiN. Doktorantka również aktywnie prezentowała wyniki swoich prac podczas konferencji krajowych i międzynarodowych.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Kluski pt. „Kempferol i jego pochodne jako związki modulujące aktywność przeciwnowotworową etopozydu” ma charakter innowacyjny, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i może stanowić podstawę do dalszych badań nad wpływem polifenoli pochodzenia naturalnego jako modulatorów działania chemioterapeutyków.

Z przyjemnością i satysfakcją stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska Pani mgr Magdaleny Kluski spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymaganiami określonymi w art. 179 ust. 1 z dn. 3 lipca 2018 – przepisy wprowadzające Ustawę Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669) w związku z art. 13 ust 1 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Dlatego zwracam się do Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Kluski do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, ze względu na wysoki poziom merytoryczny rozprawy, szeroki zakres i wysoką jakość przeprowadzonych badań, jak również wysoką wartość poznawczą pracy oraz opublikowanie wyników w renomowanych czasopismach z listy JCR (łącznie

IF=20,069), co oznacza, że manuskrypty zostały dokładnie zrecenzowane przez międzynarodowych ekspertów i zyskały ich uznanie, składam do Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne wniosek formalny o wyróżnienie pracy.

dr o. KIEROWNIKA ZAKŁADU
Higieny Radiacyjnej i Radiobiologii
NIZP PZH-PIB
M. Dobrzyńska
dr hab. n. med. Małgorzata Dobrzyńska