

Katowice, 02.06.2023

Jolanta Kwaśniewska, dr hab., prof. UŚ
Zespół Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Gabrieli Katarzyny Gajek

„Modulowanie biologicznej aktywności irinotekanu i jego metabolitu (SN38) przez ester fenyloetylowy kwasu kawowego (CAPE) w badaniach *in vitro*”

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska mgr Gabrieli Katarzyny Gajek została wykonana w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Genetyki Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Promotorem rozprawy jest dr hab. Renata Kontek, Prof. UŁ.

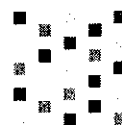
Rozprawa doktorska została przedstawiona do recenzji w formie monografii. Stanowi ona wartościowe, oryginalne opracowanie opisujące rozwiązanie problemu naukowego. Rozprawa składa się kolejno z następujących rozdziałów: *Spisu treści, Wykazu skrótów, Wstępu, Celu pracy, Materiału i metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków, Streszczenia w języku polskim i angielskim, Zestawienia dorobku naukowego Doktorantki oraz Literatury*. Zdjęcia i tabele są włączone do rozdziałów *Materiał i metody* oraz *Wyniki* i nie stanowią odrębnych rozdziałów rozprawy. Rozprawa doktorska liczy 145 stron. Układ rozprawy doktorskiej jest prawidłowy, zgodnie z przyjętymi zasadami dla prac doktorskich w naukach przyrodniczych.

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice
tel.: 32 20 09 592, 32 20 09 461, e-mail: ibbios.wnp@us.edu.pl

www.us.edu.pl/institut/ibbios



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Opis i ocena merytoryczna rozprawy

Celem badań w ocenianej rozprawie doktorskiej jest ocena wpływu aktywnego komponentu propolisu - estru fenyloetylowego kwasu kawowego (CAPE) na aktywność biologiczną komórek nowotworowych przewodu pokarmowego. Kolejnym celem wyznaczonym przez Doktorantkę było określenie stopnia, w jakim CAPE może modulować efekty toksyczne indukowane przez lek przeciwnowotworowy - irinotekan i jego metabolit SN38 w komórkach linii nowotworowych przewodu pokarmowego. Do badań wybrano 4 linie komórkowe:

- AGS (ludzka linia komórek nabłonkowych gruczołakoraka żołądka),
- HT29 (ludzka linia komórek gruczołaka jelita grubego)
- HCT116 (ludzka linia komórek nabłonkowych gruczołakoraka jelita grubego)
- Caco-2 (ludzka linia komórek nabłonkowych gruczołaka jelita grubego).

Wybór linii nowotworowych do badań został doskonale uzasadniony przez Doktorantkę. Wybór ten wynikał z odmiennego profilu genetycznego tych linii, co „pozwoiliło uzyskać zróżnicowane odpowiedzi genetyczne na zastosowane układy doświadczalne”. Z kolei linia komórkowa Caco-2 o wysokim stopniu podobieństwa do prawidłowych komórek nabłonka jelit stanowi model referencyjny w analizach bioaktywności związków chemicznych. Wybrane do badań linie komórkowe oraz warunki ich hodowli zostały wyczerpująco scharakteryzowane w rozdziale *Material i metody*.

Rozprawa zawiera skrupulatnie przygotowany *Wykaz skrótów*. Mimo tego uważam, że w dalszej części pracy Doktorantka używając skrótu po raz pierwszy w danym rozdziale powinna zamieścić jego wyjaśnienie.

Wstęp został napisany w sposób przejrzysty i przystępny, a zawarte treści wyczerpująco przedstawiają zakres wiedzy stanowiący wprowadzenie do rozprawy. Rozdział ten ma prawidłową strukturę, a zawartość merytoryczna tego rozdziału została dobrze przemyślana. Doktorantka charakteryzuje propolis oraz ester fenyloetylowy kwasu kawowego (CAPE) oraz jego znane przeciwnowotworowe właściwości oraz znany wpływ na transformację nowotworową. Osobny podrozdział poświęcony jest charakterystyce irinotekanu, jego zastosowaniu w medycynie oraz oddziaływaniu z suplementami diety. *Wstęp* prowadzi do jasno sprecyzowanego celu.

Cele pracy zostały trafnie określone i są poprawnie sformułowane. Należy podkreślić, że postawione cele pracy zostały przez mgr Gabrielę Gajek w pełni osiągnięte. W tym miejscu chciałam podkreślić niezwykle ważny aplikacyjny, zarówno społeczny, jak i prozdrowotny aspekt badań

przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej. Stosowanie suplementów diety jest obecnie niezwykle powszechne i często pozbawione specjalistycznej kontroli. Szczególne zagrożenie dla zdrowia człowieka stanowi stosowanie kilku różnych suplementów diety bez kontroli i bez wiedzy o ich efektach działania, ale również, co bardzo istotne, o ich wzajemnych interakcjach. Produkty oparte na propolisie, jako że są naturalne, i co należy podkreślić ogólnie dostępne, należą do grupy specyfików często i samowolnie stosowanych. Wobec tego poznanie mechanizmów działania tych preparatów stosowanych jako uzupełnienie codziennej diety, jak i w leczeniu onkoterapeutycznym jest niezwykle istotne. ‘

Rozdział *Material i metody* jest opisany starannie, z uwzględnieniem szczegółowych procedur, stanowi on cenny materiał źródłowy i na jego podstawie można powtórzyć wszystkie eksperymenty. Sugerowałabym jednak przeniesienie podrozdziału ‘III.3.2. Pasaż’ do podrozdziału *Material badawczy*, tuż za opisem linii komórkowych i metod ich hodowli. W spisie treści (III.2.) brakuje też „linii komórkowej Caco-2”. *Spis treści* zawiera również błędy w numerowaniu kolejnych podrozdziałów (przykładowo dwukrotnie III.3.2. i dalsze tego konsekwencje). W moim odczuciu zabrakło też w tym rozdziale opisu metod statystycznych zastosowanych w rozprawie do oceny istotności wyników. Pragnę podkreślić, że eksperymentalny układ *in vitro* wraz z wykorzystanymi metodami analitycznymi zastosowany przez Doktorantkę jest w tego typu badaniach ogólnie przyjęty. Dobór materiałów i metod jest poprawny dla osiągnięcia celów rozprawy, a układy doświadczalne zaplanowane właściwie i z zachowaniem należytych powtórzeń i innych standardów.

Przeprowadzone ilościowe, niezwykle czasochłonne analizy, wskazują na doskonale opanowany warsztat metodyczny Doktorantki w zakresie oceny: cytotoksyczności, genotoksyczności, poziomu stresu oksydacyjnego, zaburzeń cyklu komórkowego i zdolności komórek do indukcji apoptozy. Rozdział *Wyniki* stanowi w rozprawie doktorskiej 52 strony. Jest przygotowany rzetelnie, w czytelny sposób. Zawiera aż 27 Rycin z wynikami obrazowymi, jak i ilościowymi. Pragnę podkreślić wysoką jakość Rycin z wykresami.

Za dwa najważniejsze osiągnięcia badawcze Doktorantki uważam wykazanie, że:

- ester fenyloetylowy kwasu kawowego (CAPE) w badanych liniach nowotworowych wykazuje silne aktywności: cytotoksyczną/genotoksyczną, antyoksydacyjną, proapoptotyczną oraz hamującą cykl komórkowy
- CAPE ma działanie antagonistyczne względem irinotekanu (CPT-11) i jego metabolitu SN38

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę pozwoliły na uzyskanie bardzo cennych wyników, stanowiących uzupełnienie dotychczasowej wiedzy dotyczącej działania propolisu i CAPE oraz ich roli w terapii antynowotworowej.

Wnioski zostały trafnie i precyzyjnie sformułowane. Częścią rozprawy jest rozdział *Literatura* zawierający najważniejsze pozycje literaturowe (aż 185 pozycji), ściśle związane z tematyką badań. Jej zakres jest odpowiedni do obecnego stanu wiedzy dotyczącej tematyki pracy doktorskiej. Doktorantka nie ustrzegła się jednak drobnych błędów edycyjnych w spisie literatury (przykładowo brak konsekwencji w stosowaniu spacji i znaków interpunkcyjnych), podobnie jak i tzw. literówek w innych częściach pracy (np. Tabela 1). Drobne błędy edycyjne w żadnym stopniu nie wpływają na moją ogólną pozytywną opinię o skrupulatnym, starannym przygotowaniu rozprawy doktorskiej. Dyskusja jest napisana w sposób dojrzały. W rozprawie doktorskiej Doktorantka stosuje poprawnie język bogaty w terminologię naukową.

W podsumowaniu, rozprawę doktorską oceniam wysoko. Założenia projektu doktorskiego są dobrze przemyślane i w pełni zrealizowane. Wybór tematyki badawczej uważam za słuszny, niezwykle ważny, o charakterze aplikacyjnym i przyszłościowym. Wyniki rozprawy doktorskiej są cenne, poszerzają dotychczasową wiedzę, dostarczają oryginalnych rozwiązań problemu badawczego o charakterze aplikacyjnym. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska w pełni przekonała mnie o wysokiej wiedzy teoretycznej Doktorantki w zakresie szeroko pojętej biologii molekularnej i genetyki, ze szczególnym uwzględnieniem genetycznych i molekularnych podstaw etiologii nowotworów, zarówno ich diagnostyki, jak i terapii. Nie mam również żadnych wątpliwości co do możliwości samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę.

Jednocześnie chcę podkreślić, że wymienione w recenzji uwagi nie umniejszają wysokiej wartości pracy.

Kilka aspektów rozprawy doktorskiej jest w mojej opinii wartych dyskusji, lub jest na tyle interesujących, że jestem ciekawa opinii Doktorantki. Prosiłabym Doktorantkę o ustosunkowanie się podczas obrony do poniższych kwestii:

1. Zastosowanie propolisu i CAPE jako cennego suplementu diety w przeprowadzonych badaniach jest oczywiście uzasadnione, ale kieruje do Doktorantki pytanie, dlaczego wybrała właśnie ten związek z całej gamy innych dostępnych suplementów diety?
2. Doktorantka opisuje zależność konsystencji propolisu w zależności od temperatury, co prawdopodobnie wynika z dużego udziału wosków i żywic w jego składzie. Zgodnie z opisem

- w rozprawie w temperaturze 30-35°C propolis staje się plastyczny. W jakiej temperaturze (i czy w ogóle) propolis może stać się płynny?
3. Czy istnieją jakiegokolwiek różnice (także te dotyczące efektów ich działania) w zsyntetyzowanym a naturalnym estrze fenyloetylowym kwasu kawowego?
 4. Jakie są dalsze plany dotyczące ewentualnego aplikacyjnego wykorzystania uzyskanych wyników badań? Jakie są dalsze plany badawcze dotyczące kontynuacji oceny wpływu CAPE na zdrowe, jak i nowotworowe komórki? Czy planowane jest rozszerzenie badań na inne linie nowotworowe? Czy istnieje możliwość przeprowadzenia badań *in vivo* np. u innych organizmów zwierzęcych?
 5. W rozdziale 1.3.2. Doktorantka przedstawia na Rycinie schemat zewnątrzkomórkowego i wewnątrzkomórkowego szlaku apoptozy. Proszę o potwierdzenie, że schemat ten jest jej autorstwa (skoro brakuje wskazania źródła)
 6. Proszę Doktorantkę o rzeczowe uzasadnienie stwierdzenia, że efekty działania CAPE są niezależne od rodzaju komórek nowotworowych i jego stężenia na podstawie danych literaturowych i własnych wyników
 7. Czy Doktorantka widzi możliwość zastosowania naturalnego propolisu w terapii antynowotworowej, biorąc pod uwagę jego zmienność składu?
 8. Interesujący jest proces wzbogacania propolisu w CAPE. Czy Doktorantka mogłaby przedstawić więcej informacji na ten temat? Czy dostępny komercyjnie propolis jest wzbogacony w CAPE?
 9. Proszę o przedstawienie obecnego stanu dotyczącego zakresu stosowania irinotekanu w leczeniu onkologicznym? Czy biorąc pod uwagę 100 - 1000x wyższą aktywność przeciwnowotworową SN38 niż irinotekanu tylko metabolit jest stosowany w terapii antynowotworowej?
 10. W związku ze stwierdzeniem, że pęknięcia nici DNA jako efekt działania irinotekanu mają miejsce głównie w regionach kodujących rRNA, bo są wolne od nukleosomów, proszę o szerszy komentarz na ten temat: jak struktura chromatyny wpływa na powstawanie pęknięć DNA i jego naprawy w aspekcie nowotworzenia i terapii onkologicznej?
 11. Jakie są cechy morfologiczne badanych linii komórek nowotworowych pozwalające na ich rozróżnienie w mikroskopie odwróconym?

12. Jak przekładała się gęstość komórek zastosowana w teście kometowym ($1,2 \times 10^5$) na rzeczywistą liczbę komórek obserwowaną w polu widzenia w mikroskopie fluorescencyjnym?
13. Które z zastosowanych w pracy doktorskiej metod (testów) można wykorzystać dla oceny żywotności, cytotoksyczności, genotoksyczności i śmierci komórkowej dla komórek roślinnych? Z jakimi modyfikacjami metod musiało by się to wiązać?
14. Jak można wytłumaczyć różnice stężeń CAPE (IC_{50}) wyznaczonych dla poszczególnych linii komórkowych do oceny efektu synergistycznego lub antagonistycznego CPT-11 i SN38? Skąd mogą wynikać różnice we wrażliwości tych komórek?

Będący częścią pracy rozdział 'Dorobek naukowy' wskazuje na wysoką aktywność naukową mgr Gabrieli Katarzyny Gajek. Jest ona autorem/współautorem 16 publikacji naukowych o łącznym IF = 67,45. Ten moim zdaniem imponujący jak na młodego pracownika naukowego dorobek naukowy wskazuje na znacznie szersze zainteresowania naukowe Doktorantki niż te będące przedmiotem rozprawy doktorskiej.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Gabrieli Katarzyny Gajek zatytułowana 'Modulowanie biologicznej aktywności irinotekanu i jego metabolitu (SN38) przez ester fenyloetylowy kwasu kawowego (CAPE) w badaniach *in vitro*' spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595), z późniejszymi zmianami z dnia 18.03. 2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz. 455) w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku (Dz. U. poz. 1669). **W związku z powyższym wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie biorąc pod uwagę wyróżniającą się jakość badań naukowych opartych na nowoczesnej metodyce oraz szczególne walory poznawcze rozprawy doktorskiej, w tym potencjalną możliwość aplikacyjnego zastosowania otrzymanych wyników w terapii przeciwnowotworowej zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.

Katowice, 02.06.2023


Jolanta Kwaśniewska, dr hab., prof. UŚ

