

Łódź dn. 12.06.2023

Prof. dr hab. n med. Ewa Brzeziańska-Lasota

Zakład Biomedycyny i Genetyki

Katedra Biologii i Mikrobiologii Medycznej UM w Łodzi

## Ocena

### **pracy doktorskiej mgr Gabrieli Katarzyny Gajek**

wykonanej w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Genetyki

Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ

**promotor pracy dr hab. Renata Kontek, prof. UŁ**

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

Właściwości biologiczne propolisu takie jak działanie biobójcze, immunostymulujące, przeciwzapalne, antyoksydacyjne czy przeciwnowotworowe, są na przestrzeni ostatnich lat intensywnie badane. Wykazano, że za powyższe właściwości propolisu odpowiadają aktywne składniki biologiczne, obecne w ekstraktach etanolowych lub wodnych, między innymi takie jak kwas kawowy (CA) i jego estry. Jak wynika z badań, ester fenyloetylowy kwasu kawowego (ang. *caffeic acid phenetyl ester* – CAPE), jest jednym z najważniejszych związków odpowiedzialnych za przeciwnowotworowe działanie ekstraktów uzyskanych z propolisu. W badaniach na modelach zwierzętach (model myszy), po podskórnym wszczepieniu komórek nowotworowych i następnie podaniu estru fenyloetylowego kwasu kawowego (CAPE) drogą iniekcji podskórnej lub pokarmową (w różnych dawkach; 5-20 mg/kg m.c.) uzyskiwano efekt hamowania rozwoju nowotworu i zmniejszenie potencjału metastatycznego komórek nowotworowych.

Również w badaniach *in vitro* na komórkach wielu ludzkich nowotworów, takich jak np.: czerniak złośliwy, rak okrężnicy, glejak mózgu, rak żołądka, czy rak płaskonaskórkowy języka, odnotowano silne działanie cytotoksyczne estru fenyloetylowego kwasu kawowego

(CAPE). Jak wynika z badań, we wszystkich tych liniach komórkowych CAPE zmniejszał proliferację i obniżał liczbę żywych komórek nowotworowych, co świadczy o wysokiej aktywności cytotoksycznej (EC50,  $\mu\text{mol/ml}$ ) tego związku, w stosunku do komórek nowotworowych.

Kolejnym ważnym zagadnieniem w obszarze badań związków aktywnych zawartych w propolisie są prace eksperymentalne - niestety nieliczne - dotyczące modulowania przez te aktywne związki toksyczności chemioterapeutyków, stosowanych w terapii nowotworów u ludzi. Jak dotychczas wykorzystanie propolisu czy jego ekstraktów ogranicza się do leczenia zmian skóry i błon śluzowych, spowodowanych najczęściej radioterapią, czy też wspomaganie leczenia chemioterapeutykami niektórych nowotworów. Dlatego też rozwój badań dotyczących szerszego wykorzystania związków aktywnych z propolisu w zapobieganiu/ leczeniu choroby nowotworowej miałoby istotne znaczenie medyczne. Właśnie w ten obszar badań wpisuje się przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Gabrieli Katarzyny Gajek. Autorka podjęła się oceny w warunkach *in vitro* wpływu aktywnego komponentu propolisu - CAPE - na aktywność biologiczną komórek linii nowotworowych przewodu pokarmowego. Autorka podjęła się także analizy w jakim stopniu CAPE może modulować toksyczność indukowaną przez irinotekan i jego metabolit SN38 w komórkach linii nowotworowych przewodu pokarmowego: raka żołądka (AGS), raka okrężnicy (HCT116) oraz gruczolakoraka jelita grubego (HT29 i Caco-2). W mojej ocenie podjęte badania są innowacyjne, i aktualne, bowiem irinotekan, lek przeciwnowotworowy z grupy inhibitorów topoizomerazy I, ma obecnie szerokie zastosowanie terapeutyczne, głównie w chemioterapii raka jelita grubego, w monoterapii lub w skojarzeniu z immunoterapią czy cytostatykami.

Wyniki przedstawionej mi do recenzji pracy zostały w większości opublikowane w 2020 roku w międzynarodowym czasopiśmie naukowym „*Molecules*”, o współczynniku oddziaływania  $IF_{2020}=4,41$ , i punktach  $MNiSW=100$  (*Antagonistic Effects of CAPE (a Component of Propolis) on the Cytotoxicity and Genotoxicity of Irinotecan and SN38 in Human Gastrointestinal Cancer Cells In Vitro*. Gajek G, Marciniak B, Lewkowski J, Kontek R.).

### **Ocena formalna**

Przedstawiona przez mgr Gabrielę Katarzynę Gajek dysertacja ma **typowy układ**, odpowiada kryteriom wynikającym z ustawy o stopniach naukowych. Liczy 158 stron wraz z szczegółowym wykazem skrótów i 185 pozycji literaturowych, z czego większość

anglojęzycznych, opublikowanych na przestrzeni ostatnich 10 lat. Zacytowana w pracy literatura obejmuje prace aktualne, trafnie dobrane jako kluczowe dla badanego tematu.

Praca została podzielona na 10 rozdziałów i obejmuje: wstęp (str 12), cele pracy (str 42), materiały i metody (str 45), wyniki (str 78), dyskusję (str 127), wnioski (str 147), streszczenia w języku polskim i angielskim (str 152), dorobek naukowy Doktorantki (str 156) oraz spis literatury (str 166).

### **Ocena szczegółowa**

Na uwagę zasługuje obszernie przygotowany **wstęp** pracy liczący 26 stron, poświęcony charakterystyce związków aktywnych obecnych w propolisie, ze szczególnym uwzględnieniem CAPE, jego aktywności proapoptotycznych, antyoksydacyjnych, przeciwzapalnych oraz przeciwnowotworowych. Dodatkowo Doktorantka scharakteryzowała szczegółowo irinotekan (CPT-11) w aspekcie mechanizmu jego działania jak i jego zastosowanie w terapii nowotworów. Scharakteryzowała także oddziaływanie tego leku z suplementami diety w aspekcie wpływu na toksyczność wywołaną przez CPT-11 oraz aktywność apoptotyczną komórek nowotworowych. W podsumowaniu stwierdzam, że wstęp pracy jest napisany rzeczowo, świadczy o szerokiej wiedzy Doktorantki w zakresie podjętego tematu badawczego. **Cel pracy** jest jasno sformułowany a wyniki pracy eksperymentalnej i założone w pracy etapy badawcze pozwoliły na zrealizowanie postawionego przez Doktorantkę celu badawczego. Zastosowana **metodyka badawcza** jest prawidłowo dobrana do zaplanowanego celu badawczego, świadczy o wysokich umiejętnościach Doktorantki jako badacza w zakresie metod biologii eksperymentalnej. Na uwagę zasługują bardzo dobrze sporządzona dokumentacja fotograficzna komórek badanych linii i wyników testu kometowego. **Wyniki pracy** Doktorantka przedstawiła w sposób usystematyzowany w oparciu o liczne ryciny (rycina 16-42) i tabele (9-18 ). Wyniki badań otrzymanych przez Doktorantkę, pozwoliły w pełni na realizację założonych w pracy celów badawczych. Doktorantka udowodniła, że ester fenyloetylowy kwasu kawowego (CAPE) w warunkach *in vitro* wpływa na aktywność biologiczną komórek badanych linii nowotworowych przewodu pokarmowego oraz że charakteryzuje się silną aktywnością cytotoksyczną i genotoksyczną w stosunku do komórek nowotworowych badanych linii ( HCT116, HT29 i AGS), wykazuje właściwości antyoksydacyjne w komórkach linii nowotworowych przewodu pokarmowego (HCT116, HT29, AGS, Caco-2) oraz działanie proapoptotycznie, poprzez wzrost aktywności kaspaz oraz hamuje cykl komórkowy w fazie G0/G1 .Doktorantka udowodniła także że CAPE moduluje w badanych liniach komórkowych efekty cytotoksyczne indukowane przez irinotekan (CPT-11)

i jego metabolit (SN38) ; zmniejsza aktywność cytotoksyczną i genotoksyczną CPT-11 i SN38 w badanych liniach komórkach ( HCT116, AGS i Caco-2). Udowodniła także, że redukuje właściwości proapoptotyczne komórek nowotworowych jak i przyczynia się do zaburzenia przebiegu cyklu komórkowego, w trakcie ekspozycji komórek na działanie irinotekanu i jego metabolitu. Jest to wyjątkowo ważny wynik badawczy, który ma zasadnicze znaczenie praktyczne. Sugeruje, że CAPE jest jednym z najważniejszych związków odpowiedzialnych za przeciwnowotworowe działanie ekstraktów propolisowych jednak osłabia efekt terapeutyczny irinotekanu. Wyniki swoich badań Doktorantka omówiła w dyskusji konfrontując je z danymi z piśmiennictwa. **Dyskusja** jest interesująca , rzeczowa , na wysokim poziomie merytorycznym, co świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

**W tym miejscu z obowiązku Recenzenta załączam kilka uwag, sugestii i zapytań:**

1. Chciałabym zauważyć, że przy tak dużej liczbie otrzymanych wyników wskazane byłoby dodatkowo syntetyczne, całkowite ich podsumowanie, najlepiej w osobnym rozdziale „*podsumowanie otrzymanych wyników*„. Doktorantka dokonała takiego syntetycznego podsumowania jedynie w przypadku wyników analizy aktywności metabolicznej komórek badanych linii poddanych działaniu CAPE, SN38 i irinotekanu (podsumowanie wyników testu MTT , strona 82)

2. W rozdziale III.1.1. (na stronie 45) – w użytym sformułowaniu „*Stock* przechowywano w temperaturze 0 – 4°C, bez dostępu światła” słowo „*Stock*” proponuję zastąpić polskim odpowiednikiem określenia – jako „*roztwór wyjściowy/ roztwór podstawowy*”

3. Na stronie 50 (jak i w kilku innych miejscach ) Doktorantka stosuje określenie „Naczynia hodowlane o pojemności 25 cm<sup>2</sup>, z komórkami linii Caco-2 przechowywano ... – zaznaczam, że pojemność jest trójwymiarowa (np. cm<sup>3</sup>) natomiast powierzchnia jest dwuwymiarowa, w hodowlach podaje się metodycznie zwykle powierzchnie hodowlane.

4. W rozdziale Materiały i metody ( wykaz odczynniki chemiczne, III .2.1. Prowadzenie hodowli komórkowych oraz oznaczanie żywotności komórek), Doktorantka nie wymienia składnika podłoża hodowlanego jak płodowa surowica bydlęca (FBS) , a jedynie albuminę surowicy wołowej (BSA), natomiast przy opisach hodowli linii komórkowych (np. str 50, 52, 53, 55) wymieniana jest „inaktywowana płodowa surowica bydlęca ...”. Z czego wynika ta różnica ?

5. W rozdziale Materiały i metody nie podano źródła pochodzenia/ zakupu linii nowotworowych przewodu pokarmowego na których prowadzony był eksperyment, proszę o uzupełnienie tej informacji .

6. Z czego wynika zastosowanie medium hodowlanego RPMI 1640 do hodowli linii komórkowej HT-29, skoro producent zaleca medium hodowlane McCoy's ?

7. Zastrzeżenie budzą sformułowania : - np. str. 51, 53, 54 „... powiększenie obiektywu 20x...” – bez podania powiększenia okularu powiększenie obiektywu nie odzwierciedla relatywnego powiększenia przedstawionego obrazu oraz - strona 50 „, sformułowanie ...w płynie hodowlanym...” – zastąpiłabym raczej określeniem „...w medium hodowlanym..” .W kilku miejscach np. strona 65 Doktorantka pisze „... komórki trypsynizowano...”- zbyt kolokwialne określenie, sugeruję zastosować opis : *zastosowano trypsynę w celu deadhezji komórek*. Następnie, strona 57 „...działanie proteazy powoduje rozpuszczenie kolagenu...” – rozpuszczanie jest zjawiskiem fizycznym, a pod wpływem trypsyny dochodzi do degradacji kolagenu. - strona 66, przy opisie przebiegu testu kometowego Doktorantka pisze : przeprowadzono elektroforezę w temperaturze 4 ° C przez 20 min przy natężeniu pola elektrycznego wynoszącym 300 mA ...” – Natężenie pola elektrycznego jest wielkością wektorowa, charakteryzująca pole elektryczne, a jednostką SI jest V/m. Sugeruję aby przy opisie metody odnieść się do podania natężenia prądu w jednostkach SI - mA .

8. Doktorantka opisuje szczegółowo zasadę działania każdego z testów co podkreśla Jej wysoką znajomość metodyki, jednocześnie nasuwa się pytanie : dlaczego Doktorantka przy dokładnym opisie testu MTT, nie uwzględniła etapu rozpuszczenia kryształów formazanu w DMSO lub izopropanolu, ponieważ kluczowe w tej metodzie jest obliczenie ilość barwnego zredukowanego/ rozpuszczonego MTT, który jest proporcjonalny do liczby aktywnych metabolicznie komórek w populacji. Dlaczego Doktorantka nie zastosowała analogicznej choć prostszej metody i łatwiejszej w interpretacji jakim jest test WST ?

9. Doktorantka w szeregu doświadczeń wykorzystuje 24h inkubacje komórek z badanymi związkami w stężeniach odpowiadających IC<sub>50</sub> wyznaczonym dla 72h inkubacji. Skąd zatem wybór 24h czasu inkubacji w pozostałych doświadczeniach ?

10. Doktorantka udowodniła że CAPE wykazuje działanie proapoptotycznie. Jakie z literatury wymienia się szlaki sygnałowe / białka związane z procesem nowotworzenia i apoptozą , które są - jako główne - modulowane przez CAPE ?

W podsumowaniu stwierdzam, że moje drobne uwagi w żadnym stopniu nie zmniejszają wartości merytorycznej przeprowadzonych badań. Przedłożona mi do oceny praca jest bardzo wartościowa, a Doktorantka wykazała się wyjątkowym przygotowaniem teoretycznym w zakresie badanych zagadnień oraz wysokim stopniem samodzielności naukowej i eksperymentalnej. Praca jest nowatorska a przedstawione wyniki badań, częściowo już opublikowane w dobrym piśmie o zasięgu międzynarodowym, wskazują na całkowitą realizację celów założonych w pracy. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Z prawdziwą przyjemnością przedkładam Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w Dyscyplinie Nauki Biologiczne wnioski o dopuszczenie Pani mgr Gabrieli Katarzyny Gajek do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej.

**Wnioskuje także o wyróżnienie rozprawy z uwagi na jej nowatorstwo, walory poznawcze i dużą wartość merytoryczną.**

Prof. dr hab. n. med. Ewa Brzeziańska-Lasota

KIEROWNIK  
Zakładu Biomedycyny i Genetyki  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
  
Prof. dr hab. n. med. Ewa Brzeziańska-Lasota