



Politechnika Łódzka



Katedra Biotechnologii Środowiskowej

Dr hab. Adriana Nowak, prof. PŁ  
Katedra Biotechnologii Środowiskowej  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Politechnika Łódzka  
ul. Wólczańska 171/173  
90-530 Łódź

Łódź, 30.08.2022 r.

### **RECENZJA**

**pracy doktorskiej mgr Magdaleny Kluski**  
**pt.: „*Kempferol i jego pochodne jako związki modulujące aktywność*  
*przeciwnowotworową etopozydu*”**  
**wykonanej w Katedrze Genetyki Molekularnej**  
**Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego**  
**w dyscyplinie nauki biologiczne**  
**pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Woźniak**  
**oraz promotora pomocniczego dr Justyny Krzyżanowskiej-Kowalczyk**

Ocenę pracy dokonano na podstawie decyzji Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne podjętej na posiedzeniu w dniu 28 czerwca 2022 r.

#### **Uzasadnienie podjęcia tematu**

W ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania wykorzystaniem substancji pochodzenia naturalnego, w tym polifenoli, w terapii przeciwnowotworowej. Poszukuje się nowych związków o wysokiej aktywności i skuteczności, z równoczesnym brakiem tzw. efektów ubocznych i bezpieczeństwem wobec komórek prawidłowych. Niektóre z takich związków mogą modulować działanie przeciwnowotworowe chemioterapeutyków poprzez zwiększenie ich efektywności i jednoczesną ochronę przed toksycznym działaniem leków przeciwnowotworowych. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena wpływu związków polifenolowych o aktywności antyoksydacyjnej – kempferolu i jego glikozydowych pochodnych na przeciwnowotworowe działanie etopozydu w badaniach *in vitro*. Podjęcie badań w danej tematyce uważam za wysoce uzasadnione.

### Formalna ocena pracy

Praca stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie czterech anglojęzycznych publikacji naukowych (jednej przeglądowej i trzech doświadczalnych), zgodny z wymaganiami 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 (Dz.U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595 z późn. zm.), który składa się z następujących artykułów:

1. Kluska M., Woźniak K. (2021) Natural Polyphenols as Modulators of Etoposide Anti-Cancer Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12):6602.  
IF 5-letni 6,132 (obecnie 6,628); 140 pkt. MEiN
2. Kluska M., Juszcak M., Wysokiński D., Żuchowski J., Stochmal A., Woźniak K. (2019) Kaempferol derivatives isolated from *Lens culinaris* Medik. reduce DNA damage induced by etoposide in peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology Research*, 8(6):896-907.  
IF 5-letni 3,217 (obecnie 3,524); 40 pkt. MEiN
3. Kluska M., Juszcak M., Żuchowski J., Stochmal A., Woźniak K. (2021) Kaempferol and Its Glycoside Derivatives as Modulators of Etoposide Activity in HL-60 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7):3520.  
IF 5-letni 6,132 (obecnie 6,628); 140 pkt. MEiN
4. Kluska M., Juszcak M., Żuchowski J., Stochmal A., Woźniak K. (2022) Effect of Kaempferol and Its Glycoside Derivatives on Antioxidant Status of HL-60 Cells Treated with Etoposide. *Molecules*, 27(2):333.  
IF 5-letni 4,588 (obecnie 5,110); 140 pkt. MEiN

Wszystkie publikacje to prace w czasopismach o zasięgu międzynarodowym powstałe w latach 2019-2022, a ich łączny 5-letni *Impact Factor* (wg listy z dn. 1 grudnia 2021 r.) wynosi 20,069 (21,316 wg listy z 16 sierpnia 2022 r.) i odpowiada 460 punktom Ministerstwa Edukacji i Nauki. Doktorantka jest pierwszą autorką we wszystkich publikacjach, natomiast w żadnej nie jest autorką korespondencyjną. Zaangażowanie własne Doktorantki w powstanie spójnego tematycznie zbioru czterech publikacji zostało oszacowane na 65-75%, w zależności od pracy (odpowiednio 75, 65, 70 oraz 70% wg numeracji 1-4), a więc we wszystkich publikacjach Doktorantka jest autorem wiodącym, co zostało potwierdzone oświadczeniami Współautorów. Doktorantka odpowiadała za współtworzenie koncepcji pracy, planowanie doświadczeń,



przewodzenie eksperymentów, analizę uzyskanych wyników, a także pisanie i przygotowanie manuskryptu.

Przedstawiony do recenzji cykl publikacji uzupełniono o 22-stronicowe opracowanie autorskie Pani Magdaleny Kluski w języku polskim pt.: „*Kempferol i jego pochodne jako związki modulujące aktywność przeciwnowotworową etopozydu*”. Doktorantka w opracowaniu przedstawiła wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zaprezentowane do oceny oraz skrócony opis prowadzonych prac wraz z omówieniem wyników zawierający: wstęp, cel pracy, materiały i metody, opis i podsumowanie wyników, wnioski oraz spis literatury uzupełniającej. Tytuł został sformułowany poprawnie. We wstępie w sposób zwięzły i syntetyczny Doktorantka zarysowała uzasadnienie podjęcia tematu pracy. Cel ogólny, cele szczegółowe oraz hipotezy badawcze zostały sformułowane w sposób jasny i czytelny. Podobnie Doktorantka zaprezentowała zastosowaną metodologię (m.in. nowoczesne metody spektrofotometryczne, ilościowy PCR w czasie rzeczywistym, cytometria przepływowa), osiągnięcia badawcze, szczegółowe podsumowanie oraz wnioski. Spis literatury jest związany z tematyką prac będących podstawą rozprawy doktorskiej. Całość wieńczy zwięzłe zredagowane streszczenie w języku polskim i angielskim. Do opracowania dołączono kopie publikacji przedłożonych do oceny. W opracowaniu autorskim zamieszczono również pozostały dorobek naukowy Doktorantki w postaci 9 prac opublikowanych w latach 2018-2022: 2 przeglądowych (w języku polskim) i 7 oryginalnych (w języku angielskim), w których Pani Magdalena Kluska jest współautorką. Są to prace z listy JCR, których sumaryczny 5-letni *Impact Factor* wynosi 40,568 (43,099 wg listy z 16 sierpnia 2022 r.) oraz 820 pkt. MEiN. Doktorantka jest również współautorką 12 komunikatów konferencyjnych o zasięgu międzynarodowym i krajowym. Sumaryczny 5-letni *Impact Factor* całego dorobku naukowego Doktorantki to 61,637 (64,415 wg listy z 16 sierpnia 2022 r.) oraz 1280 pkt. MEiN. Liczba cytowań publikacji, bez autocytowań wynosi (stan z 15.08.2022 r.): 66 (baza WoS) oraz 57 (baza Scopus), a wartość indexu Hirscha 4 (WoS oraz Scopus). Opracowanie autorskie zostało przedstawione bardzo rzetelnie, nie mam uwag od strony edytorskiej.

Doktorantka uzyskała dotację celową dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich do sfinansowania badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, a pracę realizowała we współpracy z Instytutem Upraw Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach, Państwowym Instytutem Badawczym (IUNG) pod kierunkiem dr Justyny Krzyżanowskiej-Kowalczyk w roli promotora pomocniczego z Zakładu Biochemii i Jakości Plonów IUNG.



## Ocena merytoryczna pracy

Główną część pracy stanowi współautorski cykl opublikowanych czterech artykułów naukowych, składających się na przemyślane i dobrze przeprowadzone studium tematyczne, które zostały już poddane procesowi recenzowania naukowego. Wszystkie wyniki zostały szczegółowo przeanalizowane i przedyskutowane w świetle badań innych autorów, co świadczy o dużej wiedzy w dyscyplinie nauk biologicznych, jak i umiejętności Doktorantki do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Doktorantka sformułowała 6 logicznych wniosków stanowiących podsumowanie podjętych badań.

Podstawą badań Doktorantki była hipoteza badawcza, że wybrane do doświadczeń związki polifenolowe mogą zmieniać aktywność przeciwnowotworową etopozydu względem komórek nowotworowych poprzez szereg mechanizmów, m.in. wpływ na żywotność komórek nowotworowych oraz uszkodzenia DNA. W publikacji przeglądowej nr 1 pt.: „Natural Polyphenols as Modulators of Etoposide Anti-Cancer Activity” opublikowanej w *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22(12):6602 (IF<sub>5-letni</sub> 6,132) Doktorantka uzasadnia powyższą hipotezę badawczą dokonując opisu dotychczasowego stanu wiedzy dotyczącego wpływu polifenoli na aktywność przeciwnowotworową etopozydu w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*.

Następnie Doktorantka wyznaczyła cele szczegółowe obejmujące określenie cyto- i genotoksyczności badanych związków w komórkach nowotworowych i prawidłowych, oszacowanie rozkładu komórek nowotworowych w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, ocenę wpływu związków badanych na proces apoptozy w komórkach nowotworowych, ocenę potencjału antyoksydacyjnego komórek oraz analizę profilu ekspresji genów kodujących enzymy odpowiedzialne za odpowiedź antyoksydacyjną komórek. Następnie Doktorantka wykonała szereg doświadczeń z wykorzystaniem kempferolu, jego 3 glikozydowych pochodnych (P 7, P 8 i P 9), frakcji polifenolowej i ekstraktu wyizolowanych z nadziemnej części soczewicy.

W publikacji doświadczalnej nr 2 pt.: “Kaempferol derivatives isolated from *Lens culinaris* Medik. reduce DNA damage induced by etoposide in peripheral blood mononuclear cells” opublikowanej w *Toxicology Research* 2019, 8(6):896-907 (IF<sub>5-letni</sub> 3,217) Doktorantka wykazała, iż kempferol zwiększa poziom uszkodzeń DNA w komórkach białaczki promielocytowej HL-60 indukowanych przez etopozyd, ale nie wpływa na poziom uszkodzeń DNA wywołanych przez etopozyd w komórkach prawidłowych krwi obwodowej (PBMC). Z kolei ekstrakt wyizolowany z zielonych części soczewicy, jak i frakcja polifenolowa wykazywały wysoką genotoksyczność względem komórek prawidłowych, co wykluczyło ich



zastosowanie jako modulatorów aktywności etopozydu. Na podstawie wyników uzyskanych w tej pracy do dalszych badań wybrano związki, które nie wykazywały toksyczności wobec komórek prawidłowych, tj. kempferol oraz jego glikozydowe pochodne.

W kolejnej publikacji doświadczalnej nr 3 pt.: „Kaempferol and Its Glycoside Derivatives as Modulators of Etoposide Activity in HL-60 Cells” opublikowanej w *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22(7):3520 (IF<sub>5-letni</sub> 6,132) oszacowano wpływ kempferolu oraz jego glikozydowych pochodnych na aktywność cytotoksyczną etopozydu w komórkach HL-60, jego właściwości proapoptotyczne, wpływ na przebieg cyklu komórkowego oraz na poziom reaktywnych form tlenu (RFT). Doktorantka stwierdziła, że kempferol zmniejszał poziom RFT w komórkach HL-60, także w tych eksponowanych na etopozyd, natomiast aktywność antyoksydacyjna glikozydowych pochodnych kempferolu różniła się i była specyficzna dla danego związku.

W publikacji doświadczalnej nr 4 pt.: „Effect of Kaempferol and Its Glycoside Derivatives on Antioxidant Status of HL-60 Cells Treated with Etoposide” opublikowanej w *Molecules* 2022, 27(2):333 (IF<sub>5-letni</sub> 4,588) Doktorantka analizowała ekspresję genów kodujących enzymy odpowiadające za ochronę antyoksydacyjną komórek, aktywność dysmutaz ponadtlenkowych oraz poziom całkowitego wewnątrzkomórkowego glutationu. Stwierdzono, iż antyoksydacyjne działanie kempferolu to nie tylko bezpośrednie zmniejszenie poziomu RFT, ale także aktywacja komórkowych mechanizmów antyoksydacyjnych związanych z ekspresją genów kodujących enzymy odpowiedzialne za tą ochronę.

Przedstawioną do oceny pracę przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Przedłożony do recenzji zbiór monotematycznych publikacji stanowi oryginalne rozwiązanie określonego problemu, a cel naukowy został zrealizowany.

#### **Uwagi i pytania**

1. Uważam, że Doktorantka zbyt słabo (lub w ogóle) wyeksponowała innowacyjność podjętych badań, zarówno w publikacjach, jak i w opracowaniu. Proszę o komentarz.
2. Dlaczego do badań Doktorantka wybrała nadziemne części soczewicy (*Lens culinaris* Medik.)? Czy są one najlepszym roślinnym źródłem kempferolu i jego pochodnych?
3. Dlaczego do badań Doktorantka wybrała komórki krwi?
4. Kempferol i jego glikozydowe pochodne zostały przygotowane w 50% DMSO. Jakiego było końcowe stężenie DMSO w przeprowadzanych eksperymentach? Czy Doktorantka określiła IC<sub>0</sub> tego rozpuszczalnika wobec zastosowanych linii komórkowych?



5. Czy są jakieś ograniczenia (przeciwwskazania) do stosowania kempferolu i jego glikozydowych pochodnych we wspomaganiu terapii przeciwnowotworowej?
6. Jaka jest aplikacyjność niniejszych badań? Jak Doktorantka wyobraża sobie wdrożenie (know-how)? W jaki sposób/jaką drogą (pokarmową? dożylną?) miałby być podawany pacjentom preparat z kempferolu/jego pochodnych? Jakie są ograniczenia w aspekcie przemian, jakim może podlegać kempferol/jego pochodne w przewodzie pokarmowym w wyniku aktywności enzymów własnych organizmu, jak i mikrobioty jelitowej?
7. Czy wykorzystanie nadziemnych części soczewicy (*Lens culinaris* Medik.) do pozyskania kempferolu i jego pochodnych na skalę przemysłową jest opłacalne? Czy opisana metoda pozyskiwania badanych związków jest opłacalna?
8. Jaka jest przyszłość niniejszego projektu? Czy będzie kontynuacja w badaniach klinicznych?

#### **Wnioski końcowe**

Praca doktorska Pani mgr Magdaleny Kluski dotyczy bardzo ważnej i aktualnej tematyki dotyczącej leczenia chorób nowotworowych, wnosi wiele elementów nowości i ma charakter nie tylko poznawczy, ale również rozwojowy i wysoce aplikacyjny. Według wiedzy Recenzentki, po przeanalizowaniu bazy PubMed, tematyka badań podjęta przez Doktorantkę w takim ujęciu jest unikatowa w skali krajowej, jak i światowej, stanowiąc oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

W mojej opinii przedstawiony do recenzji zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie czterech oryginalnych artykułów naukowych spełnia wymagania merytoryczne i formalne stawiane pracom doktorskim zgodnie z 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 (t.j. Dz.U. z 2017 r., poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669).

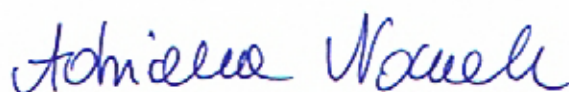
Zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Kluski do dalszych etapów w przewodzie doktorskim.

#### **Wniosek o wyróżnienie**

Doktorantka wykonała szereg badań dotyczących możliwości modulowania etopozydu przez kempferol oraz związki wyizolowane z nadziemnych części soczewicy (*Lens culinaris* Medik.) – tj. 5 glikozydowych pochodnych kempferolu, frakcję oraz ekstrakt roślinny.

Doktorantka zastosowała metody badawcze na poziomie komórkowym (np. określenie cyto- i genotoksyczności w komórkach nowotworowych i prawidłowych, ocena wpływu badanych związków na proces apoptozy w komórkach nowotworowych), jak i molekularnym (np. analiza profilu ekspresji genów kodujących enzymy odpowiedzialne za odpowiedź antyoksydacyjną komórek). Potwierdzeniem warsztatu badawczego zaprezentowanego w rozprawie doktorskiej jest cykl 4 bardzo dobrych publikacji o wysokim poziomie merytorycznym, wydanych w czasopiśmie znaczących z punktu widzenia nauk biologicznych, w których Doktorantka jest pierwszą autorką z udziałem ponad 60%, a 3 z 4 artykułów posiada 140 pkt. MEiN. Współczynnik wpływu tych prac wynosi IF 21,316 (wg listy z 16 sierpnia 2022 r.) i odpowiada 460 punktom MEiN. Wymienione powyżej aspekty, a także wysoce nowatorski i aplikacyjny charakter badań oraz ocena pracy w recenzji są podstawą do złożenia wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Kluski.

Wniosuję zatem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o wyróżnienie przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Kluski pt.: *„Kempferol i jego pochodne jako związki modulujące aktywność przeciwnowotworową etopozydii”*.



dr hab. Adriana Nowak, prof. PL