



dr hab. inż. Anna Olejnik  
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
ul. Wojska Polskiego 48  
60-627 Poznań

Poznań, dnia 6 listopada 2017 roku

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**  
**mgr Katarzyny Owczarek**  
**„Ocena aktywności przeciwzapalnej flawanolowych ekstraktów**  
**wyizolowanych z nasion wiesiołka i owoców pigwowca”**

wykonanej w Zakładzie Biochemii Międzywydziałowej Katedry Chemii i Biochemii Medycznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem dr hab. Urszuli Lewandowskiej

*Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi uchwała Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz pismo Prodziekana ds. Nauki prof. dr hab. n. med. Agnieszki Wierzbowskiej z dnia 12.10.2017 r.*

Praca doktorska mgr Katarzyny Owczarek dotyczy analizy aktywności biologicznej dwóch ekstraktów flawanolowych pozyskanych z owoców pigwowca japońskiego i wyciągów z nasion wiesiołka dziwnego w aspekcie działania przeciwzapalnego i przeciwnowotworowego na komórki nowotworowe jelita grubego linii SW-480. Praca porusza bardzo interesujące i aktualne zagadnienie związane z poszukiwaniem naturalnych związków bioaktywnych o potencjalnym zastosowaniu w prewencji i terapii chorób cywilizacyjnych, wśród których czołowe miejsce zajmują choroby nowotworowe. Obecnie duże nadzieje pokłada się w chemoprewencji, czyli zapobieganiu nowotworom poprzez zastosowanie nietoksycznych środków farmakologicznych lub naturalnych substancji bioaktywnych, umożliwiających spowolnienie, zatrzymanie, a nawet odwrócenie powstałych zmian. Uważa się, że wdrożenie działań chemoprewencyjnych może w przyszłości ograniczyć występowanie niektórych nowotworów, w tym nowotworów jelita grubego. Chemoprewencja ma szczególne uzasadnienie w przypadku pacjentów z podwyższonym ryzykiem zachorowalności na ten typ nowotworu, związanym z predyspozycjami genetycznymi, stanami przedrakowymi, czy nieswoistymi stanami zapalnymi jelit. Obecnie chemoprewencja ma ograniczone zastosowanie w walce z rakiem jelita grubego z uwagi na brak jednoznacznych dowodów na działanie przeciwnowotworowe w badaniach klinicznych. Wieloletni proces onkogenezy oraz brak czułych i miarodajnych markerów do monitorowania zmian nowotworowych sprawiają, że badania nad wpływem naturalnych związków bioaktywnych na inicjację i rozwój tego nowotworu oparte są głównie na zastosowaniu komórkowych i zwierzęcych modeli doświadczalnych. Doskonalenie modeli komórkowych i tkankowych oraz rozwój metod analitycznych sprawiają, że wiele zagadnień związanych z procesem kancerogenezy możemy

analizować w systemach *in vitro*, uzyskując wiarygodny materiał źródłowy do dalszych badań prowadzonych z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych.

Uważam zatem, że tematyka podjęta w pracy doktorskiej jest bardzo istotna i dobrze wpisuje się w aktualne zainteresowania wiodących ośrodków naukowych. Badania na nowotworowych i prawidłowych komórkach nabłonka jelita grubego, z zastosowaniem różnorodnych metod analitycznych umożliwiających śledzenie zjawisk zachodzących w komórkach na poziomie molekularnym i komórkowym, pozwoliły zrealizować założone cele i uzyskać wiarygodne dane dowodzące potencjalnej aktywności przeciwzapalnej ekstraktów flawanolowych w odniesieniu do stanów zapalnych jelit.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Owczarek ma układ typowy dla prac doktorskich przedstawianych w formie cyklu publikacji i obejmuje: wstęp literaturowy, założenia i cel pracy, omówienie wyników i wnioski, spis piśmiennictwa, streszczenie w języku polskim i w języku angielskim, wykaz publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej oraz ich kopie. Na końcu zamieszczono dorobek naukowy Doktorantki, w tym spis publikacji i komunikatów konferencyjnych, udział w projektach badawczych oraz wykaz otrzymanych nagród.

We wstępie literaturowym Autorka opisała rolę jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, cyklooksygenazy 2 (COX-2) i metaloproteinazy macierzy MMP-9 w procesie zapalnym i nowotworowym zlokalizowanym w jelicie grubym oraz przedstawiła ogólną charakterystykę wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa* Hudziok) i pigwowca japońskiego (*Chaenomeles japonica* Lindl.). W tym rozdziale zawarto również informacje o pochodzeniu materiału roślinnego i sposobie otrzymania ekstraktów flawanolowych. W tym miejscu zamieszczono także dane na temat zawartości związków polifenolowych w analizowanych preparatach. Moim zdaniem zagadnienia metodyczne i uzyskane wyniki przedstawione w podrozdziałach 1.5., 1.5.1 i 1.5.2. nie powinny być zamieszczone w rozdziale pt. „Wstęp literaturowy”.

W kolejnej części rozprawy Doktorantka sformułowała główny cel badań, którym była „ocena potencjału przeciwzapalnego dwóch preparatów flawanolowych otrzymanych z nasion wiesiołka dziwnego i z owoców pigwowca japońskiego w modelu *in vitro*” oraz cele szczegółowe obejmujące: otrzymanie ekstraktów i charakterystykę profilu polifenolowego, oznaczenie cytotoksyczności ekstraktów dla nowotworowych i prawidłowych komórek jelita grubego, ocenę wpływu ekstraktów na ekspresję COX-2, ekspresję i aktywność MMP-9 oraz ekspresję NF- $\kappa$ B i fosforylację jego podjednostki p65 w komórkach nowotworowych linii SW-480. W następnych rozdziałach opisano najważniejsze rezultaty badań (rozdział III) i podsumowano w postaci wniosków (rozdział IV). Materiały i metody badań, dane otrzymane w przeprowadzonych doświadczeniach i szczegółowy ich opis oraz dyskusja poprowadzona w świetle aktualnej wiedzy pochodzącej z doniesień światowej literatury, zawarto w publikacjach eksperymentalnych, które składają się na rozprawę doktorską.

Zasadnicza część rozprawy doktorskiej to cykl czterech tematycznie spójnych prac. Dwie z nich stanowią prace eksperymentalne opublikowane w renomowanych czasopismach z bazy *Journal Citation Reports (JCR): Journal of Functional Foods* (IF<sub>2016</sub>=3,144; 45 punktów MNiSW) i *Acta Biochimica Polonica* (IF<sub>2016</sub>=1,159; 15 punktów MNiSW). Dwie kolejne to prace przeglądowe, które opublikowano w czasopismach *Nutrition and Cancer* (IF<sub>2016</sub>=2,447; 25 punktów MNiSW) oraz *Postępy Fitoterapii* (7 punktów MNiSW). Łączna wartość współczynnika oddziaływania (IF<sub>2016</sub>) publikacji wchodzących w skład rozprawy wynosi 6,75, a suma punktów wg wykazu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego - 92, co świadczy o wysokim poziomie przeprowadzonych badań, ocenionych przez niezależnych specjalistów i wydawców. Wszystkie publikacje to opracowania zbiorowe, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Na podstawie oświadczenia o merytorycznym wkładzie Doktorantki w powstanie przedstawionych prac, można stwierdzić, że jej udział był znaczący. Polegał na współplanowaniu eksperymentów, przygotowaniu modeli komórkowych do badań oraz wykonaniu eksperymentów i większości analiz, w tym oznaczeń cytotoksyczności ekstraktów, analiz ekspresji genu COX-2 metodą Real-Time PCR, detekcji białek NF-κB, COX-2 i MMP-9 metodą Western Blot, analiz zymograficznych metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 oraz współuczestnictwie w analizie fosforylacji podjednostki p65 NF-κB na cytometrze przepływowym. Doktorantka wskazała również na swój wkład w opracowanie i dyskusję otrzymanych wyników. W odniesieniu do prac przeglądowych Doktorantka złożyła oświadczenie o napisaniu manuskryptów. Biorąc pod uwagę układ autorów w pracach oraz złożone oświadczenie, należy stwierdzić, że udział mgr Katarzyny Owczarek w wymienionych pracach był wiodący i są one jej autorskim osiągnięciem naukowym. W związku z powyższym, uważam, że Doktorantka jest uprawniona do przedstawienia prezentowanego cyklu publikacji jako podstawy do ubiegania się o nadanie stopnia doktora.

W pracach przeglądowych wchodzących w skład rozprawy opisano dotychczasowe wyniki badań na modelach *in vitro* i *in vivo* oraz badań klinicznych, wskazujące na przeciwzapalne działanie związków polifenolowych, polegające na ograniczeniu ekspresji cytokin prozapalnych (IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α) oraz obniżeniu aktywności enzymów cyklooksygenazy i lipooksygenazy, zaangażowanych w metabolizm kwasu arachidonowego. Podkreślono również, że potencjał przeciwzapalny polifenoli może być związany z hamowaniem czynnika NF-κB, który kontroluje ekspresję genów regulujących wiele procesów komórkowych, w tym: proliferację komórek, apoptozę, metastazę, angiogenezę i odpowiedź zapalną. Szczególną uwagę zwrócono na rolę NF-κB i COX-2 w procesach zapalnych i nowotworach jelita grubego, do których odnosi się część eksperymentalna pracy. Obie prace przeglądowe, wchodzące w skład rozprawy, opublikowane w 2017 roku, przedstawiają aktualną wiedzę i stanowią bardzo dobry wstęp do tematyki podejmowanej w dysertacji. Zawierają też doskonałe uzasadnienie celowości podejmowanych badań.

Pozostałe prace, składające się na rozprawę doktorską, dotyczą badań nad wpływem preparatów flawanolowych na ekspresję genów i białek NF- $\kappa$ B, COX-2, MMP-9 i MMP-2, związanych z procesem kancerogenezy, w ludzkich komórkach nowotworu jelita grubego linii SW-480. Obie przedstawione publikacje dotyczą tych samych zagadnień badawczych, analizowanych w oparciu o taki sam projekt doświadczeń, przy zastosowaniu tych samych modeli komórkowych i metod analitycznych. Dlatego poniższa ocena merytoryczna odnosi się do obu prac.

Przedmiot badań stanowiły dwa preparaty flawanolowe otrzymane z wyłoków z nasion wiesiołka dzikiego (praca I) i owoców pigwowca japońskiego (praca II). Scharakteryzowano je pod względem zawartości związków polifenolowych za pomocą ultra-wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. W pierwszym etapie badań biologicznych oznaczono poziom cytotoksyczności preparatów dla nowotworowych komórek nabłonkowych okrężnicy linii SW-480 w odniesieniu do prawidłowych fibroblastów linii CCD-18Co pochodzących z błony podstawnej nabłonka okrężnicy. Stwierdzono, że potencjał cytotoksyczny preparatów dla komórek pochodzenia nowotworowego jest znacznie wyższy niż dla komórek izolowanych z tkanki prawidłowej. Uważam za wartościowe badania prowadzone na modelu komórek prawidłowych w celu wykazania potencjalnego cytotoksycznego działania preparatu ukierunkowanego na komórki nowotworowe i podkreślenia jego bezpieczeństwa dla komórek prawidłowych. Jednakże polecałabym zastosowanie prawidłowych komórek okrężnicy o morfologii nabłonkowej, np. CCD 841 CoN (ATCC), które stanowią próbę odniesienia lepiej odpowiadającą zastosowanemu modelowi nabłonkowych komórek nowotworowych niż fibroblasty linii CCD-18Co. Kolejna sugestia dotyczy wyboru metody oznaczenia poziomu cytotoksyczności, alternatywnej dla metody barwienia jąder komórkowych fioletem krystalicznym. Wnioskowanie o żywotności komórek barwionych fioletem krystalicznym jest pewnym nadużyciem, ponieważ stosowana metoda daje informacje jedynie o liczbie komórek. Myślę, że w przyszłości wykonanie jeszcze jednego testu pozwalającego na oznaczenie żywotności i aktywności metabolicznej komórek byłoby cennym uzupełnieniem informacji o potencjale cytotoksycznym analizowanej grupy związków. Biorąc pod uwagę aktywność antyproliferacyjną ekstraktów, ciekawym kierunkiem badań byłaby analiza mechanizmów działania ekstraktów, w tym ingerencja w cykl komórkowy, czy indukcja śmierci apoptotycznej nowotworowych komórek jelita grubego. Zagadnienia związane ze specyficznym działaniem analizowanych związków ukierunkowanym na komórki nowotworowe będą zapewne przedmiotem kolejnych publikacji, które z przyjemnością przeczytam.

Kluczowe aspekty prac eksperymentalnych rozprawy doktorskiej dotyczą wpływu preparatów flawanolowych na ekspresję jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B jako regulatora ekspresji wielu genów zaangażowanych w proces kancerogenezy. Na podstawie wyników analizy Western Blot stwierdzono, że ekstrakty flawanolowe obniżają ekspresję białka NF- $\kappa$ B w nowotworowych

komórkach SW-480. Wykazano również, że w wyniku ekspozycji komórek SW-480 na ekstrakty dochodzi do hamowania fosforylacji podjednostki p65 czynnika NF- $\kappa$ B i tym samym do ograniczenia jego potencjału transkrypcyjnego. Zdolność inhibicji NF- $\kappa$ B, poprzez hamowanie aktywności kinaz, które odpowiedzialne są za jego fosforylację i odłączenie od inhibitora I $\kappa$ B, została opisana w literaturze również dla innych grup związków polifenolowych.

Obniżenie potencjału transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B może prowadzić do ograniczenia aktywacji ekspresji genów zaangażowanych w różne procesy związane z kancerogenezą, w tym proliferację komórek, apoptozę, proces zapalny, inwazyjność, czy przerzutowanie. Z uwagi na to, że promotorowe regiony cyklooksygenazy COX-2 i metaloproteinazy MMP-9 zawierają specyficzne sekwencje wiążące czynnik NF- $\kappa$ B, zmniejszenie aktywności NF- $\kappa$ B wywołane przez ekstrakty może prowadzić do ograniczenia ekspresji COX-2 i MMP-9. W obu pracach eksperymentalnych, wchodzących w skład dysertacji, Doktorantka udowodniła, że testowane preparaty obniżają nadekspresję COX-2 zarówno na poziomie mRNA (wyniki analizy Time PCR), jak i na poziomie białka (dane otrzymane w analizach Western Blot i ELISA). Doktorantka wykazała także inhibujący wpływ ekstraktów na ekspresję i aktywność białka MMP-9, posługując się odpowiednio: metodą Western Blot i analizą zymograficzną.

Przedstawiana w pracach bioaktywność preparatów flawanolowych jest bardzo dobrze udokumentowana wynikami analiz prowadzonych zarówno na poziomie komórkowym, jak i molekularnym. Tak więc wnioski z przeprowadzonych doświadczeń, zamieszczone w dysertacji, są w pełni uzasadnione. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała wniosek końcowy o cytotoksycznej, przeciwzapalnej i przeciwinwazyjnej aktywności testowanych preparatów flawanolowych i ich potencjalnym zastosowaniu w profilaktyce i terapii nowotworów jelita grubego. Zgadzam się z Doktorantką, że wyniki uzyskane w badaniach *in vitro* potwierdzają wysoką aktywność biologiczną preparatów i „czynią je interesującymi obiektami dalszych badań *in vivo*”, które powinny dostarczyć informacji o biodostępności analizowanych związków w jelicie grubym oraz potwierdzić ich potencjał przeciwzapalny i przeciwnowotworowy po pasażu przez przewód pokarmowy.

Dorobek naukowy mgr Katarzyny Owczarek obejmuje w sumie 15 publikacji, które ukazały się w renomowanych czasopismach o łącznej wartości IF 17,94 i sumie punktów MNiSW 257. Wymienione publikacje były cytowane 80 razy w źródłach indeksowanych w bazie *Web of Science*. Indeks Hirscha mgr Katarzyny Owczarek w tej bazie wynosi 7, co jest bardzo dobrym rezultatem dla naukowca przed uzyskaniem stopnia doktora. Na duże zaangażowanie Doktorantki w pracę naukową wskazuje również udział w sześciu projektach badawczych realizowanych w latach 2007-2014, finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Narodowe Centrum Nauki oraz Uniwersytet Medyczny w Łodzi. Wyrazem uznania są Nagrody I i III stopnia

przyznane mgr Katarzynie Owczarek przez JM Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za osiągnięcia naukowe w latach 2008, 2014, 2016 i 2017.

Po zapoznaniu się z otrzymaną dokumentacją uważam, że praca doktorska mgr Katarzyny Owczarek stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego, a uzyskane wyniki są istotnym elementem w rozwoju badań nad mechanizmami przeciwzapalnego i przeciwnowotworowego działania związków flawanolowych w odniesieniu do stanów zapalnych i nowotworów jelita grubego. Stwierdzam zatem, że przedstawiona rozprawa doktorska, będąca spójnym tematycznie cyklem czterech publikacji, pod wspólnym tytułem „Ocena aktywności przeciwzapalnej flawanolowych ekstraktów wyizolowanych z nasion wiesiołka i owoców pigwowca” w pełni odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. 2016 poz. 1586). Wniosuję zatem do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Katarzyny Owczarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę aktualną tematykę i wysoki poziom badań przedstawionych w dysertacji, dotyczących poszukiwań naturalnych związków bioaktywnych i możliwości ich stosowania w prewencji i wspomaganiu terapii nowotworów jelita grubego, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału o wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej.

*Anna Olejnik*

dr hab. inż. Anna Olejnik