



Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

Dr hab. **Beata Sadowska**, prof. nadzw. UŁ
Kierownik Pracowni Biologii Zakazań
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź

Łódź, 03. 11. 2017 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Owczarek pt.: „**Ocena aktywności przeciwzapalnej flawanolowych ekstraktów wyizolowanych z nasion wiesiołka i owoców pigwowca**”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska została wykonana przez mgr Katarzynę Owczarek w Zakładzie Biochemii, Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pod kierunkiem Dr hab. n. med. Urszuli Lewandowskiej i dotyczy oceny aktywności przeciwzapalnej flawanolowych ekstraktów wyizolowanych z nasion wiesiołka i owoców pigwowca w kontekście profilaktyki oraz wspomaganie skuteczności terapii chorób zapalnych i zmian nowotworowych w obrębie jelit. Podstawę dysertacji stanowią cztery artykuły naukowe, w tym dwie prace przeglądowe i dwie oryginalne prace eksperymentalne, o łącznym współczynniku oddziaływania $IF=6,750$ i 92 punktach ministerialnych (MNiSW), opublikowane w bieżącym roku. Dysertacja zawiera również komentarz Autorki do wspomnianych prac, obejmujący wstęp literaturowy, założenia i cele pracy, wyniki, wnioski, literaturę oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Pani K. Owczarek jest pierwszym autorem wszystkich artykułów stanowiących trzon rozprawy doktorskiej i zgodnie z przedłożonym oświadczeniem miała decydujący wkład w ich powstanie.

Według danych statystycznych rak jelita grubego (ang. *colorectal cancer*, CRC) znajduje się w czołówce nowotworów złośliwych pod względem liczby zachorowań i śmiertelności. Od lat 90. XX w. zanotowano zaledwie 2% spadek śmiertelności z powodu CRC mimo rozwoju technik wczesnego wykrywania zmian nowotworowych i powiększenia asortymentu dostępnych chemioterapeutyków. Początkowy obraz kliniczny choroby może być bowiem niejasny z uwagi na często poprzedzające CRC zmiany zapalne jelit. Dowiedziono, iż nieswoiste choroby zapalne jelit, takie jak wrzodziejące zapalenie jelita grubego czy choroba Leśniowskiego-Crohna, w sposób istotny zwiększają ryzyko rozwoju CRC. Umiejętność ograniczenia zmian zapalnych już na poziomie transkrypcji określonych genów, poprzez blokowanie aktywności jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, wydaje się być godną uwagi koncepcją profilaktyki nowotworów zależnych od rozwoju zmian zapalnych. Powiązanie zahamowania ekspresji NF- κ B z obniżoną produkcją enzymów, takich jak cyklooksygenaza 2 (COX-2) i kolejno metaloproteiny macierzy (MMPs), wskazuje równocześnie na nowe cele terapeutyczne w badaniach nad alternatywnymi i/lub wspomagającymi strategiami leczenia raka jelita grubego. Nadprodukcję ww. enzymów obserwuje się bowiem w rozwoju wielu zmian nowotworowych, a dzięki zdolności rozkładu białek zewnątrzkomórkowej macierzy (ECM) przez metaloproteiny przypisuje się im istotną rolę w inwazji komórek nowotworowych i procesie metastazy czyli powstawaniu przerzutów.

W świetle powyższego założony cel pracy, który stanowiła analiza potencjału przeciwzapalnego, obejmującego wpływ na poziom ekspresji NF- κ B, COX-2 i MMP-9, dwóch preparatów flawanolowych otrzymanych z nasion wiesiołka dziwnego i z owoców pigwowca japońskiego, uważam za istotny i w pełni uzasadniony. Co prawda aktywność przeciwzapalna bogatych w polifenole ekstraktów roślinnych jest szeroko opisywana w literaturze, ale preparaty flawanolowe z wiesiołka i pigwowca badane były po raz pierwszy, a przedstawione w recenzowanej pracy próby dociekania molekularnych mechanizmów takiego działania na dobrze dobranym modelu *in vitro*, obejmującym zarówno komórki prawidłowe nabłonka jelitowego (fibroblasty linii CCD-18Co), jak i komórki raka jelita grubego (linia SW-480), stanowią dobrą podstawę naukową wskazań aplikacyjnych tych ekstraktów. Tym bardziej, iż preparaty stanowiące tzw. suplementy diety nie podlegają, tak jak klasyczne leki, wymogowi prowadzenia badań klinicznych.

We **Wstępie** teoretycznym do prac stanowiących trzon dysertacji, przygotowanym w oparciu o właściwie dobraną literaturę, Doktorantka omówiła znaczenie aktywności NF- κ B, nadprodukcji COX-2 i metaloproteiny 9 (MMP-9) w rozwoju raka jelita grubego. Wybór analizowanych elementów reakcji zapalnej i dociekania ich wzajemnych korelacji uważam za trafny w kontekście potencjalnego zastosowania terapeutycznego ekstraktów wyizolowanych z nasion wiesiołka i owoców pigwowca oraz próby wyjaśnienia mechanizmów ich działania przeciwzapalnego. W rozdziale tym przedstawiono również charakterystykę wiesiołka dziwnego i pigwowca japońskiego – roślin stanowiących źródło badanych ekstraktów oraz sposób uzyskiwania i analizę fitochemiczną składu tych preparatów przeprowadzone we współpracy z Instytutem Biochemii Technicznej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. Pewien niedosyt budzą natomiast znikome informacje na temat polifenoli – obszernej grupy związków stanowiących główne składniki czynne ekstraktów roślinnych będących przedmiotem rozprawy. *W związku z powyższym proszę Doktorantkę o krótką wypowiedź na temat szerokiej aktywności biologicznej polifenoli, z pominięciem aspektów aktywności przeciwzapalnej omawianych w pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.*

Obie prace przeglądowe stanowiące podstawę dysertacji mgr K. Owczarek są doskonałym wprowadzeniem teoretycznym do zrealizowanych badań eksperymentalnych. Dokonany w pracy pt. „Aktywność przeciwzapalna związków polifenolowych” przegląd literatury na temat działania przeciwzapalnego zarówno wyizolowanych czystych związków polifenolowych (takich jak galusan epigallokatechiny, apigenina, kurkumina, kempferol), jak i złożonych preparatów (np. ekstrakty z owoców malin, jabłek, pestek winogron), uprawomocnia postawioną w recenzowanej pracy hipotezę badawczą na temat możliwej aktywności biologicznej badanych ekstraktów z nasion wiesiołka i owoców pigwowca. Wskazane w literaturze mechanizmy działania związków polifenolowych, obejmujące ingerencję w aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, syntezę cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α), fosforylację kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK), produkcję indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS), COX-2 czy lipooksygenazy (LOX), potwierdzają trafność wyboru elementów procesu zapalnego poddanych analizie w niniejszej dysertacji. W drugiej pracy przeglądowej zatytułowanej „The impact of dietary polyphenols on COX-2 expression in colorectal cancer” Autorka wskazała na udział procesu zapalnego w rozwoju wielu zmian patologicznych, w tym chorób układu krążenia i układu oddechowego, chorób autoimmunologicznych, neurodegeneracyjnych, cukrzycy czy

nowotworów, omawiając szczegółowo raka jelita grubego, udział COX-2 w jego rozwoju oraz wyniki badań prowadzonych *in vitro* i *in vivo* nad wykorzystaniem polifenoli do hamowania aktywności tego enzymu w przebiegu CRC. Tym samym założenie recenzowanej dysertacji dotyczące praktycznego wykorzystania ekstraktów z nasion wiesiołka i owoców pigwowca w profilaktyce i leczeniu raka jelita grubego wydaje się w pełni uzasadnione.

Weryfikację postawionych hipotez badawczych mgr K. Owczarek przeprowadziła w badaniach *in vitro*, których wyniki zostały opublikowane w dwóch oryginalnych pracach eksperymentalnych dotyczących aktywności biologicznej nasion wiesiołka dziwnego (Owczarek K. i wsp.: Inhibition of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase-2, and metalloproteinase-9 expression by flavanols from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) in human colon cancer SW-480 cells. *J. Funct. Foods*, 2017) i owoców pigwowca japońskiego (Owczarek K. i wsp.: Flavanols from Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) fruit suppress expression of cyclooxygenase-2, metalloproteinase-9 and nuclear factor-kappaB in human colon cancer cells. *Acta Biochim.*, 2017). Schemat eksperymentalny obu prac jest podobny i został oparty na dobrze przemyślanym planie, obejmującym fitochemiczną charakterystykę badanych preparatów, ocenę ich aktywności cytotoksycznej, analizę ekspresji NF- κ B, COX-2 i MMP-9 na poziomie mRNA z wykorzystaniem metody real time PCR i/lub na poziomie białek z zastosowaniem metody ELISA, Western blot lub zymografii żelatynowej, a także ocenę fosforylacji podjednostki p65 NF- κ B z użyciem cytometrii przepływowej. W jednej z prac dodatkowo sprawdzono ekspresję MMP-2 w komórkach SW-480 poddanych działaniu ekstraktu z owoców pigwowca. Wykorzystany zestaw metod jest bogaty i świadczy o bardzo dobrym warsztacie badawczym Doktorantki. Zakładając prowadzenie dalszych badań naukowych pragnę jedynie zaproponować rozważenie zmiany metody oceny cytotoksyczności związków/preparatów dla komórek eukariotycznych. Bardziej wiarygodną, powtarzalną i czułą, niż zastosowane barwienie fioletem krystalicznym, jest powszechnie uznana i stosowana metoda oceny redukcji MTT (bromek 3-[4,5-dimetylotiazol-2-yl]-2,5-difenylotetrazoliowy). Prawidłowa ocena cytotoksyczności tego typu preparatów, co badane ekstrakty, zarówno w stosunku do komórek nowotworowych, jak i prawidłowych, pozwala wstępnie ocenić ich przydatność do zastosowania w praktyce. Badania przeprowadzone w recenzowanej pracy doktorskiej pozwoliły na wybranie zakresu stężeń ekstraktu z wiesiołka i pigwowca (25-100 μ M CE), w których preparaty te wykazywały cytotoksyczność dla komórek nowotworowych linii SW-480, przy zachowaniu względnego bezpieczeństwa dla prawidłowych fibroblastów jelitowych linii CCD-18Co. Biorąc pod uwagę wyznaczone

stężenie IC₅₀ preparatu z wiesiołka dla komórek linii SW-480 (100 μM CE po 48 godzinnej inkubacji) należałoby w dalszych badaniach ostrożnie interpretować rezultaty wpływu tego ekstraktu użytego w stężeniu 100 μM CE na ekspresję badanych markerów zapalenia, zakładając możliwość eliminacji komórek w reakcji cytotoksycznej.

W eksperymentalnej części badań wykazano zależne od stężenia badanych preparatów flawanolowych istotne statystycznie hamowanie produkcji NF-κB i fosforylacji jego podjednostki p65, obniżanie ekspresji mRNA dla COX-2 i syntezy tego enzymu oraz hamowanie produkcji i sekrecji MMP-9. Pani K. Owczarek i współautorzy słusznie zauważają, iż redukcja poziomu fosforylacji NF-κB może być wynikiem ograniczenia samej syntezy tego czynnika w obecności badanych ekstraktów. Generalnie obniżeniu ulega potencjał transkrypcyjny NF-κB, co jest odpowiedzialne, przynajmniej częściowo, za obserwowane zmiany w ekspresji COX-2 i MMP-9. Uzyskane wyniki uważam za wartościowe zarówno z punktu widzenia badań podstawowych wyjaśniających mechanizmy przeciwzapalnego działania bogatych w polifenole ekstraktów roślinnych, jak i z praktycznego punktu widzenia, pozwalającego na naukowe poparcie wskazań do zastosowania tego typu ekstraktów w profilaktyce i wspomaganiu leczenia wybranych zmian nowotworowych. Rezultaty tych badań zostały również docenione przez niezależnych recenzentów prac opublikowanych w uznanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, takich jak Journal of Functional Foods.

Wyniki badań dotyczących aktywności biologicznej ekstraktów flawanolowych otrzymanych z nasion wiesiołka i z owoców pigwowca mgr K. Owczarek podsumowała w rozdziale **Wnioski**. Na ich podstawie Autorka wysuwa w pełni uprawniony wniosek o przeciwzapalnym, antyinwazyjnym i antyangiogennym potencjale badanych preparatów, wskazując na możliwość ich zastosowania w profilaktyce i wspomaganiu klasycznej terapii raka jelita grubego. *W tym miejscu pragnę zapytać Doktorantkę czy na podstawie przeprowadzonych badań i w oparciu o dostępną literaturę można już wskazać formę podania/formulację i wyznaczyć wstępny schemat dawkowania ekstraktów z nasion wiesiołka i owoców pigwowca tak, by stężenia związków czynnych osiągnęły in vivo przyniosły skutek terapeutyczny? Proszę również o przedstawienie powiązania badanych mechanizmów działania preparatów roślinnych z procesem angiogenezy.*

W dysertacji wykorzystano 51 pozycji literatury uzupełniającej, nie włączając referencji zawartych w publikacjach stanowiących trzon rozprawy doktorskiej. W większości są to prace anglojęzyczne, opublikowane w latach 2001-2016 (jedna pozycja z 1994 r. i patent z 1992 r.). Wszystkie publikacje są związane z tematyką pracy, zostały prawidłowo dobrane i zacytowane.

Prace eksperymentalne oraz jeden artykuł przeglądowy stanowiące podstawę dysertacji zostały napisane w języku angielskim, natomiast drugi artykuł przeglądowy i pozostała opisowa część pracy – w języku polskim. W obu przypadkach Autorka posługuje się ładnym, przyjaznym czytelnikowi językiem, choć nie uniknęła pewnych niezręczności stylistycznych, przykładowo: „wzbudza ekspresję genów, takich jak prozapalne cytokiny...” (str. 7). Zauważone błędy nie umniejszają jednak ogólnej bardzo dobrej oceny merytorycznej niniejszej dysertacji.

Wniosek końcowy

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Katarzyny Owczarek wnosi istotne wartości poznawcze w kontekście potencjału aplikacyjnego wybranych naturalnych ekstraktów roślinnych oraz spełnia wszystkie wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom na stopień naukowy doktora. Z pełnym przekonaniem wnioskuję zatem do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Katarzyny Owczarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
PRACOWNI BIOLOGII ZAKAŻEŃ UŁ
B. Sadowska
dr hab. Beata Sadowska, prof. nadzw. UŁ

dr hab. B. Sadowska, prof. nadzw. UŁ