



Warszawa 12.09.2022

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Chojnackiej

pt.: „Ocena potencjału chemoprewencyjnego ekstraktów fenolowych z liści pigwowca japońskiego”

Nowotwory stanowią jeden z głównych problemów zdrowia publicznego współczesnego społeczeństwa na całym świecie. Zgodnie ze statystykami WHO stanowią drugą pod kątem częstości przyczynę zgonów. Rak jelita grubego jest trzecim najczęściej diagnozowanym nowotworem zarówno u kobiet jak i u mężczyzn. Czynnikiem rozwoju raka jelita grubego jest wiele. Do najbardziej istotnych zalicza się predyspozycje genetyczne oraz czynniki środowiskowe takie jak niska aktywność fizyczna, nadwaga, otyłość, niezbalansowana dieta, nadmierne spożycie alkoholu czy palenie tytoniu. Cześć z czynników ryzyka jest bezpośrednio związana z wywoływaniem przewlekłego stanu zapalnego w jelitach. Ważny dla ryzyka rozwoju raka jelita grubego jest także stan mikrobioty jelitowej u pacjenta. Wykazano, że częste lub przewlekłe stosowanie antybiotyków wiąże się zarówno z powstawaniem przewlekłego stanu zapalnego jak i może prowadzić do dysbiozy mikrobiomu jelitowego przez co wzrasta prawdopodobieństwo powstawania procesu nowotworzenia w jelitach.

Chemoprewencja definiowana jako zastosowanie substancji pochodzenia naturalnego lub syntetycznego w celu zapobiegania lub spowolnienia procesu nowotworzenia stanowi obecnie ważną strategię będącą alternatywą dla klasycznej terapii, która jest zwykle dużo bardziej obciążającą dla pacjentów. Jedną z kluczowych metod chemoprewencyjnych jest stosowanie diety bogatej w związki pochodzenia naturalnego o udokumentowanym działaniu przeciwnowotworowym i niskiej toksyczności. Rolę chemoprewencyjną poza składnikami żywności mają także roślinne surowce lecznicze. Badania nad chemoprewencyjnymi właściwościami związków pochodzenia naturalnego stanowią prężnie rozwijającą się gałąź nauki. W wielu przypadkach pomimo obserwowanego działania prewencyjnego w stosunku do zapadalności na różnego rodzaju nowotwory dla wielu składników pochodzenia roślinnego dokładny mechanizm ich działania nadal nie jest wyjaśniony.



W ramach swojej rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyna Chojnacka postanowiła bliżej przyrzeć się właściwościom przeciwzapalnym oraz przeciwnowotworowym ekstraktów bogatych w polifenole uzyskanych z liści pigwowca japońskiego (*Chaenomeles japonica*).

Pigwowiec japoński jest rośliną pochodzącą z Japonii, powszechnie uprawianą w Chinach i krajach nadbałtyckich (m. in. w Polsce) jako roślina ozdobna. Owoce pigwowca są stosowane jako żywność. Z rośliny tej przygotowuje się m.in. soki i konfitury. W literaturze można znaleźć liczne badania dokumentujące, że owoce pigwowca są bogatym źródłem polifenoli oraz witamin. Wyciągi z owoców posiadają wiele udokumentowanych działań biologicznych. Z drugiej strony liście pigwowca wykorzystane jako materiał przez Doktorantkę są również uznawane za dobre źródło związków pochodzenia naturalnego o aktywności przeciwutleniającej. W literaturze brakuje natomiast szczegółowych badań dotyczących tego surowca zarówno od strony składu chemicznego jak i potencjału przeciwzapalnego i przeciwnowotworowego.

Przedłożona rozprawa doktorska została przygotowana w formie zbioru publikacji poświęconych badaniom składu oraz aktywności biologicznych ekstraktów przygotowanych z liści pigwowca japońskiego. W skład cyklu wchodzi także trzy prace poglądowe dotyczące aktywności biologicznych wyciągów bogatych w polifenole. Dodatkowo przedłożone publikacje są opatrzone wstępem teoretycznym, opisem celu pracy oraz podsumowaniem uzyskanych wyników badań.

W skład pracy wchodzi następujące oryginalne i przeglądowe publikacje naukowe opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR:

1. **Katarzyna Chojnacka**, Dorota Sosnowska, Dominika Polka, Katarzyna Owczarek, Krystyna Gorlach-Lira, Bruno Oliveira de Verasa, Urszula Lewandowska. Comparison of phenolic compounds, antioxidant and cytotoxic activity of extracts prepared from Japanese quince (*Chaenomeles japonica* L.) leaves. *Journal of Physiology and Pharmacology*.2020; 71 (2):213-222.DOI: 10.26402/jpp.2020.2.05
IF = 3,011; MEIN = 100
2. **Katarzyna Chojnacka**, Katarzyna Owczarek, Miłosz Caban, Dorota Sosnowska, Dominika Polka, Maria Koziółkiewicz, Jakub Fichna, Urszula Lewandowska. Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) leaf phenol extract as modulator of the inflammatory response in lipopolysaccharide-triggered murine macrophage RAW264.7 cells. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2020, 71 (6): 833- 843.DOI:10.26402/jpp.2020.6.07
IF = 3,011; MEIN = 100
3. **Katarzyna Chojnacka**, Katarzyna Owczarek, Miłosz Caban, Dorota Sosnowska, Dominika Kajszczyk, Urszula Lewandowska. Chemopreventive effects of Japanese quince (*Chaenomeles japonica* L.) phenol leaf extract on colon cancer



cells through the modulation of ERK/AKT signaling pathway. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2022; 73 (1): DOI: 10.26402/jpp.2022.1.04

IF = 3,011; MEiN = 100

4. **Katarzyna Chojnacka**, Urszula Lewandowska. The influence of polyphenol-rich extracts on production of pro-inflammatory mediators in macrophages. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2021; 72 (2):167-176. DOI: 10.26402/jpp.2021.2.02 IF = 3,011; MEiN = 100

5. **Katarzyna Chojnacka**, Urszula Lewandowska. Inhibition of Pro-Inflammatory Cytokine Secretion by Polyphenol-Rich Extracts in Macrophages via NF- κ B Pathway. *Food Reviews International*. 2022; 1-20. DOI: 10.1080/87559129.2022.2071936 IF = 6,478; MEiN = 100

6. **Katarzyna Chojnacka**, Urszula Lewandowska. Chemopreventive effects of polyphenol-rich extracts against cancer invasiveness and metastasis by inhibition of type IV collagenases expression and activity. *Journal of Functional Foods*. 2018; 46: 295-311. DOI: 10.1016/j.jff.2018.05.001

IF = 4.451; MEiN = 100

Sumaryczny współczynnik oddziaływania przedłożonych prac to 16.495 co odpowiada 600 pkt MEiN. Każda z prac została opatrzona stosownym opisem wkładu Doktorantki oraz oświadczeniami współautorów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że we wszystkich załączonych publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem a jej wkład w powstanie każdej z nich był wiodący. Pod tym względem przedłożona rozprawa spełnia wszystkie formalne i zwyczajowe wymagania stawiane tego typu pracom w dziedzinie nauk medycznych i o nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk medycznych. W mojej ocenie osiągnięcia publikacyjne Pani mgr Katarzyny Chojnackiej są wyróżniające się na tle innych prac doktorskich, z którymi miałem przyjemność zapoznawać się w ostatnich latach.

W publikacji nr 1 Doktorantka zajęła się przygotowaniem surowego ekstraktu z liści pigwowca oraz ekstraktu bogatego w polifenole poprzez zastosowanie frakcjonowania metodą SPE. Oba wyciągi zostały poprawnie scharakteryzowane pod kątem jakościowym i ilościowym z użyciem metody chromatograficznej UHPLC-DAD-Q-TOF-MS. Ten aspekt przeprowadzonych prac jest szczególnie ważny, gdyż rzutuje na wszystkie dalsze badania biologiczne z użyciem wytworzonego materiału. Pragnę nadmienić, że w wielu współcześnie publikowanych pracach naukowych nadal nie przeprowadza się wystarczającej charakterystyki chemicznej badanych ekstraktów roślinnych co jest oczywistym niedociągnięciem a w wielu przypadkach błędem. W tej samej pracy Doktorantka dodatkowo oceniła potencjał przeciwutleniający obu wyciągów z użyciem metod bezkomórkowych (ABTS oraz FRAP). Są to metody proste w użyciu i dostarczające wstępnych informacji na temat potencjału antyoksydacyjnego badanego materiału. Niestety wyniki uzyskane z użyciem obu podejść mają niewielkie przełożenie na działanie wyciągu



roślinnego *in vivo*. Ponadto mgr Chojnacka podjęła próbę oceny właściwości cytotoksycznych w odniesieniu do dwóch linii komórek nowotworowych z użyciem testu MTT.

W drugiej pracy włączonej do cyklu doktorskiego mgr Chojnacka zajęła się oceną właściwości przeciwzapalnych uzyskanych wcześniej ekstraktów. W tym celu użyła modelu komórkowego mysich makrofagów typu RAW 264.7. Stan zapalny odgrywa znaczącą rolę w procesie nowotworowym stąd obecnie zwraca się dużą uwagę na substancje mogące zmniejszać stan zapalny w miejscu procesu nowotworzenia. W ramach przeprowadzonych badań Doktorantka oceniła cytotoksyczność wyciągów, ich wpływ na produkcję wybranych mediatorów stanu zapalnego takich jak tlenek azotu (NO), wybrane enzymy prozapalne COX-2 i iNOS, ekspresję wybranych genów i białek odpowiadających za szlaki sygnalizacyjne kluczowe dla rozwoju odpowiedzi zapalnej. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów po raz pierwszy udokumentowały, że bogaty w polifenole ekstrakt z liści pigwowca hamuje odpowiedź zapalną makrofagów. Wykazano, że w ramach obserwowanej aktywności przeciwzapalnej zahamowaniu ulegają kluczowe szlaki sygnalizacyjne co przekłada się na produkcję lub wydzielanie czynników prozapalnych m.in. interleukin.

Trzecia publikacja wchodząca w skład przedłożonej rozprawy doktorskiej dotyczy badań nad mechanizmami działania przeciwnowotworowego bogatego w polifenole ekstraktu z liści pigwowca. Doktorantka wykazała, że wyciąg hamuje migrację komórek nowotworowych z użyciem linii nowotworu jelita grubego SW-480 oraz HT-29. Udowodniła w przypadku obu modeli komórkowych, że mechanizm działania przeciwnowotworowego ekstraktu polega na zahamowaniu aktywności matrycowych metaloproteinaz 2 i 9 oraz na hamowaniu fosforylacji AKT w szlaku kluczowym szlaku sygnalizacyjnym. Ponadto badania dowiodły, że ekstrakt bogaty w polifenole wpływa na inną kinazę (ERK) – hamująco dla linii SW-480 i stymulująco dla linii HT-29. Uzyskane wyniki po raz pierwszy wskazują na potencjalny mechanizm działania związków pochodzenia naturalnego zawartych w liściach pigwowca japońskiego.

Trzy kolejne prace załączone jako część niniejszej rozprawy to publikacje przeglądowe. Doktorantka wraz z Promotorką dokonała szerokiego przeglądu literatury dotyczącej wpływu ekstraktów bogatych w polifenole na funkcje prozapalne w wybranych modelach. W pracy opublikowanej w *Journal of Physiology and Pharmacology* Autorki skupiły się na oddziaływaniu ekstraktów roślinnych na mediatory stanu zapalnego



produkowane/wydzielane przez makrofagi ludzkie i zwierzęce. W publikacji przyjętej do *Food Reviews International* Doktorantka szeroko omówiła węższe zagadnienie dotyczące wpływu wyciągów polifenolowych na hamowanie wydzielania cytokin poprzez modulowanie ścieżki sygnałowej angażującej NF- κ B. Ostatnia praca w cyklu doktorskim opublikowana w *Journal of Functional Foods* została poświęcona wpływowi ekstraktów roślinnych bogatych w polifenole na inwazyjność i przerzutowość komórek nowotworowych w kontekście hamowania ekspresji kolagenz typu IV. Wszystkie trzy prace pogładowe są bardzo dobrze przygotowane i przemyślane. Wskazują jednoznacznie na wyrobienie przez mgr Chojnącką umiejętności krytycznego przeglądu literatury na dany temat oraz zdolności do syntetycznego podsumowywania dostępnych w bazach danych doniesień. Wszystkie trzy publikacje zostały przyjęte do renomowanych czasopismach zagranicznych. Dwie z nich są opublikowane w bardzo prestiżowych tytułach poświęconych badaniom nad żywnością.

Po lekturze przedłożonej rozprawy doktorskiej nie mam wątpliwości, że spełnia ona formalne i zwyczajowe kryteria stawiane tego typu opracowaniom. Doktorantka przedstawiła w pracy oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i udowodniła swoją ogromną ogólną wiedzę teoretyczną w zakresie uprawianej dyscypliny naukowej. Tym samym Doktorantka spełnia wymagania wymienione w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym.

W trakcie przygotowywania niniejszej recenzji nasunęło mi się kilka uwag i pytań. **Prosiłbym, aby Doktorantka odniosła się do każdego z poniższych punktów.**

1. W literaturze istnieją doniesienia, że w przypadku ekstraktów zawierających polifenole badanie cytotoxycznosci metodą MTT może być zaburzone ze względu na silne właściwości redox związków występujących w wyciągach. Czy Doktorantka badała wpływ próbek na żywotność stosowanych linii komórkowych z użyciem innej metodologii? Jakich innych metod można by użyć, aby uniknąć ewentualnych interferencji?
2. W pierwszej pracy z cyklu Doktorantka wskazuje na selektywność danych ekstraktów w stosunku do linii nowotworowych vs. komórki prawidłowe. Proszę o podanie dowolnej miary tej selektywności. Jaka standardową substancję o działaniu cytotoxycznym stosowała Doktorantka w badaniach i jaka była selektywność tego związku?

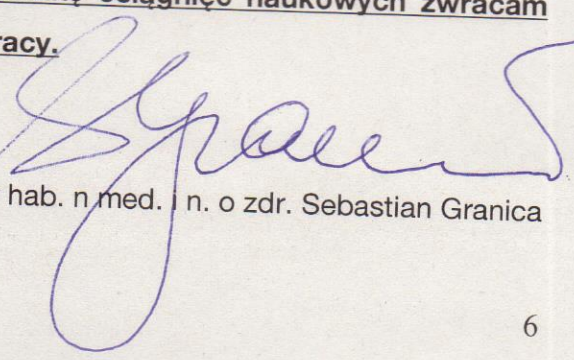


3. Charakterystyka ekstraktów została przeprowadzona metodą HPLC-DAD-MS. Chromatogram zamieszczony w pierwszej pracy wydaje się być „urwany”. Czy po zakończeniu akwizycji danych na ok. 13 min nie obserwowano dalszej elucji składników ekstraktów?
4. Związek 17 w tabeli 1 pierwszej pracy scharakteryzowano jako „*quercetin glucoside acylated*”. Na jakiej podstawie wyciągnięto taki wniosek? Względny czas retencji nie wskazuje na to, aby to mogła być tego typu substancja.
5. W tabeli 1 pierwszej pracy zamieszczono oznaczenia ^{1, 2, 3, 4, ...} przy przygotowywaniu recenzji miałem problem z odnalezieniem legendy do zastosowanych skrótów. Proszę o wskazanie co oznaczają te cyfry.
6. W pracach przeglądowych Doktorantka omawia wpływ ekstraktów bogatych w polifenole na różne funkcje biologiczne. W ocenie Doktorantki, które z badanych wcześniej ekstraktów wywierały podobny wpływ jak wyciąg z liści pigwowca? Czy któryś z tych wyciągów miał podobny skąd jakościowy/iłościowy?

Powyższe pytania i komentarze nie wpływają w sposób istotny na jakość recenzowanej pracy i wynikają w dużej mierze z zainteresowania tematyką badań prowadzonych przez Panią mgr Chojnicką.

Przechodząc do podsumowania niniejszej recenzji stwierdzam, że przedłożona przez mgr Katarzynę Chojnicką rozprawa doktorska pt.: „Ocena potencjału chemoprewencyjnego ekstraktów fenolowych z liści pigwowca japońskiego” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w związku z czym zwracam się do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie mgr Katarzyny Chojnickiej do dalszych etapów prowadzonego przewodu doktorskiego.

Jednoznacznie popieram starania Doktorantki o nadanie stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk medycznych. Biorąc pod uwagę wysoki poziom przedstawionych przez Doktorantkę osiągnięć naukowych zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie recenzowanej pracy.


prof. dr hab. n. med. n. o zdr. Sebastian Granica