

Dr hab. Magdalena Łuczak, prof. ICHB PAN

Poznań, 22.01.2026

Zakład Proteomiki Biomedycznej

E-mail: magdału@ibch.poznan.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Moniki Sapety-Nowińskiej pt. „Modulacja metabolizmu komórkowego przez kurkuminę, metforminę i hesperydynę w modelach *in vitro*: stresu oksydacyjnego, nowotworowym i zapalnym”.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Moniki Sapety-Nowińskiej została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod opieką promotora prof. dr. hab. Piotra Młynarza oraz promotor pomocniczej dr Katarzyny Gębczak. Badania eksperymentalne wykonano w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej oraz w Zakładzie Podstaw Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Doktorantka ubiega się o stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie: nauki chemiczne.

Praca ma charakter klasycznej monografii i składa się ze wstępu teoretycznego, części metodycznej, opisu wyników zawierającego częściową dyskusję wyników, dyskusję ogólną oraz zaprezentowanych na końcu rozprawy - wniosków. Rozdział nr 6 dysertacji zaznajamia nas z dorobkiem naukowym doktorantki.

Celem rozprawy było zbadanie wpływu stresu oksydacyjnego na metabolizm komórek ssaczych w warunkach *in vitro* oraz ocena działania trzech związków o właściwościach przeciwzapalnych i antyoksydacyjnych: metforminy, kurkuminy i hesperydyny, w warunkach stresu oksydacyjnego i zapalnego. Aby osiągnąć cel główny zrealizowano kilka celów szczegółowych:

1) Dokonano indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach *in vitro*, a następnie przeanalizowano wpływ kurkuminy i metforminy na zaindukowany stres oksydacyjny.

2) Zaindukowano stan zapalny w komórkach, a następnie dokonano oceny wpływu kurkuminy i metforminy i hesperydiny w modulacji odpowiedzi zapalnej.

Analizy w obu przypadkach obejmowały ocenę żywotności komórek, pomiar poziomu reaktywnych form tlenu (ROS), badanie apoptozy oraz profilowanie metabolomiczne metodą NMR.

W pierwszym etapie indukowano stres oksydacyjny z użyciem różnych stężeń H_2O_2 w komórkach linii HEK-293 oraz COS-7 – a następnie oceniano cytotoksyczność zastosowanych dawek oraz analizowano poziom ROS po traktowaniu. Na podstawie uzyskanych danych wybrano warunki indukcji ROS zastosowane w kolejnych eksperymentach. Obie linie wykazywały odmienną odporność na zastosowany stres i inną stabilność metaboliczną. Wyniki opublikowano w czasopiśmie *Acta Biochimica Polonica* w 2025 roku.

W drugim etapie porównano wpływ kurkuminy i metforminy na komórki nienowotworowe: HEK-293 i nowotworowe: SW-982 w warunkach stresu oksydacyjnego. Oceniono przeżywalność i poziom ROS oraz porównano profile metabolomiczne wykonując analizę NMR. Stwierdzono działanie cytoprotekcyjne i antyoksydacyjne kurkuminy i metforminy w komórkach nienowotworowych w warunkach stresu oksydacyjnego. Stwierdzono, że kurkumina modulowała głównie metabolizm aminokwasów i reakcje redoks, natomiast metformina – przemiany nukleotydów, aminokwasów, lipidów i metabolizm energetyczny.

W przypadku komórek nowotworowych, metformina i kurkumina wywoływały efekt odwrotny, tj. zaburzały równowagę energetyczną oraz obniżały przeżywalność komórek w warunkach stresu wywołanych traktowaniem H_2O_2 . Analizy NMR ujawniły, że podobnie jak w komórkach nienowotworowych, oba związki odmiennie modulowały szlaki metaboliczne i metabolizm energetyczny.

W trzecim etapie mgr inż. Sapeta-Nowińska oceniła działanie kurkuminy, metforminy, jak również hesperydiny, w warunkach zapalnych. W tym przypadku Doktorantka zdecydowała się ponownie wykorzystać nowotworową linię SW-982 jako komórkowy model reumatoidalnego zapalenia stawów. Komórki poddano stymulacji cytokiną prozapalną $TNF-\alpha$ w 2 różnych stężeniach, a następnie przeanalizowano wpływ metforminy, kurkuminy i hesperydiny na komórki w kontekście cytotoksyczności, stresu oksydacyjnego oraz właściwości proapoptotycznych analizowanych związków. Doktorantka wykonała również porównawczą analizę metabolomiczną i stwierdziła, że analizowane związki, choć wykazują odmiennie działanie na szlaki i ścieżki metabolizmu komórkowego, to wykazują potencjał

ochronny co objawiało się częściowej normalizacją profilu metabolomicznego. Wyniki porównawczej analizy z użyciem podejścia NMR ujawniły deregulację procesu glikolizy i metabolizmu aminokwasów po zastosowaniu kurkuminy oraz wzrost GSH i wpływ na metabolity związane z reakcjami redoks po metforminie. Z kolei hesperydyna aktywowała odpowiedź antyoksydacyjną i indukowała stres metaboliczny.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr inż. Sapety-Nowińskiej dotyczy ważnej dziedziny badań jakimi są poszukiwania związków niskocząsteczkowych przydatnych do modulowania stresu oksydacyjnego w komórkach nienowotworowych, nowotworowych oraz w modelu zapalnym, w kontekście potencjału terapeutycznego. W pracy uwagę zwraca klarowny i wyczerpujący wstęp literaturowy, który wprowadza czytelnika zarówno w obszar tematyki stresu oksydacyjnego, opisu działania metforminy, kurkuminy i hesperydyny, jak również podejścia NMR do porównawczych analiz metabolomicznych w celu śledzenia zmian zachodzących w komórkach. Również część metodyczną opisano w sposób bardzo szczegółowy, umożliwiając odtworzenie zaprezentowanych eksperymentów. Opis dostarcza wszystkich niezbędnych informacji, liczba powtórzeń biologicznych i technicznych jest jasno opisana i wystarczająca do uzyskania wiarygodnych danych, a kontrolne eksperymenty wykonane w sposób prawidłowy, umożliwiając właściwą interpretację wyników. Zwraca również uwagę wyczerpująco opisana analiza statystyczna. Bardzo spodobała mi się także organizacja części wynikowej, zawierająca opis wyników danego zestawu eksperymentów, a następnie ich częściowa dyskusja co ułatwiło zrozumienie i pozwalało nadażać za ciągiem przyczynowo - skutkowym pokazanym w pracy. Na końcu dysertacji znajdujemy dyskusję ogólną wszystkich wyników i wnioski końcowe, podsumowujące jeszcze raz całą pracę.

Podczas obrony, poprosiłabym o odniesienie się do poniższych kilku uwag/pytań:

- 1) W próbkach linii HEK-293 traktowanych H_2O_2 zidentyfikowano metodą NMR sygnały nieobecne w liniach kontrolnych. Czy mogą to być metabolity powstające w wyniku wtórnego metabolizmu samego H_2O_2 ?
- 2) Dlaczego w eksperymentach dotyczących wpływu kurkuminy i metforminy na zaindukowany stres oksydacyjny nie zastosowano linii COS-7? Ponieważ obie linie, HEK-293 i COS-7 odmiennie reagowały na stres, zastosowanie obu linii w eksperymentach z kurkumina i metforminą być może dostarczyłoby interesujących danych na temat różnicowego wpływu obu związków w zależności od stopnia wrażliwości komórek na stres oraz adaptacji metabolicznej w warunkach stresu. Zamiast tego, zastosowano kurkuminę i metforminę na

modelu komórek nienowotworowych oraz nowotworowych, co również jest niezwykle istotne, niemniej jednak linia COS-7 w interesujący sposób, dopełniłaby uzyskany obraz.

3) W pracy myląc zastosowano wyrażenia „relatywne stężenie” odnoszące się do metabolitów zidentyfikowanych metodą NMR. Bardziej odpowiednie byłoby zastosowanie wyrażen „relatywna/względna akumulacja”, „relatywny/względny poziom” ponieważ *de facto* w pracy nie badano stężenia (ilość w przeliczeniu na objętość lub masę), a jedynie ilość danego metabolitu w porównaniu do innej wartości, w tym przypadku do metabolitu zidentyfikowanego w kontroli.

4) Na jakiej podstawie stwierdzono, że kurkumina i metformina działają przeciwzapalnie na komórki HEK-293 w warunkach stresu oksydacyjnego, co sugerują tytuły rozdziałów 4.2.1.2, 4.2.3.1.3.1, 4.2.3.1.3.2? Przeprowadzone analizy potwierdzają wpływ cytoprotekcyjny i antyoksydacyjny, co jednak nie jest tożsame w aktywnością przeciwzapalną. Zapalenie i stres oksydacyjny są ze sobą związane i często jeden napędza drugi, jednak wymienne stosowanie obu wyrażen jest zbyt dużym skrótem myślowym. Mam podobną uwagę do oceny skuteczności indukcji zapalenia z użyciem testu cytotoksyczności MTT oraz pomiaru ROS po stymulacji TNF- α przeprowadzonego w rozdziale 4.3.1. Oba badania, choć niezwykle istotne, nie są w stanie jednoznacznie potwierdzić indukcji stanu zapalnego.

5) Porównawcze analizy metabolomiczne z wykorzystaniem metody NMR, przeprowadzono zarówno na komórkach jak i medium hodowlanym. W przypadku medium, zwykle problemem w takich analizach jest glukoza, której poziom jest kilkakrotnie wyższy, w porównaniu do reszty związków, a z tabeli na str. 50 wynika, że pracy stosowano m. in. pożywkę DMEM z wysokim stężeniem glukozy 4.5g/L. Czy obserwowano ten problem w przeprowadzonych w dysertacji analizach?

Poniżej kilka drobnych uwag i sugestii technicznych dotyczących pracy:

1) W pracy zamiennie stosowano terminy metaboliczne i metabolomiczne. Szlaki są metaboliczne, jednak analiza lub analizowane profile określamy jako metabolomiczne ponieważ badano metabolity a nie metabolizm.

2) Prędkość wirowania w części metodycznej nie powinna być podawana w obrotach na minutę tylko w jednostkach g by zapewnić powtarzalność eksperymentów bez znajomości promienia rotora stosowanej wirówki.

3) Podczas analizy danych NMR dodano bardzo małą wartość *pseudo-count* w celu uniknięcia problemu dzielenia przez zero. Ponieważ przeprowadzone analizy miały charakter porównawczy, lepszą metodą wydaje się pomnożenie wszystkich danych, zarówno pochodzących z kontroli jak i grupy traktowanej, przez stały mnożnik. Pozwala to uniknąć ujemnych wartości w przypadku logarytmowania danych, a nie wpływa na uzyskaną krotność zmian czyli tzw. fold change.

Podsumowując stwierdzam, że uzyskane wyniki prezentują wysoką wartość merytoryczną, a Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną oraz praktyczną z zakresu prowadzonych przez siebie prac badawczych, postawiła przed sobą ambitne i jasne cele naukowe, a następnie je zrealizowała. Otrzymane wyniki dostarczają ważnych informacji istotnych dla zrozumienia mechanizmów molekularnych leżących u podłoża działania antyoksydacyjnego i antynowotworowego metforminy, kurkuminy i hesperydyny.

W świetle powyższych danych i z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana przeze mnie dysertacja zawiera istotne elementy nowości naukowej, oryginalności i spełnia ustawowe kryteria stawiane kandydatom do stopnia doktora sformułowane w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571). **W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Moniki Sapety-Nowińskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne.**

Magdalen
a Łuczak

Elektronicznie podpisany
przez Magdalena Łuczak
Data: 2026.01.26
15:23:30 +01'00'

dr hab. Magdalena Łuczak, prof. ICHB PAN