

Katowice, 29.01.2026 r.

prof. dr hab. Michał Daszykowski

Instytut Chemii  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach

ul. Szkolna 9  
40-006 Katowice

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

Powierzona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Moniki Sapety-Nowińskiej została wykonana na Wydziale Chemii Politechniki Wrocławskiej w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii pod opieką promotora w osobie Pana prof. dr hab. Piotra Młynarza oraz promotora pomocniczego, Pani dr Katarzyny Gębczak. Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora zostało wszczęte przez Radę Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Praca doktorska Pani mgr inż. Moniki Sapety-Nowińskiej ma formę zwartą, tzn. opublikowane artykuły naukowe w recenzowanych czasopismach nie są jej integralną częścią. Wyniki badań, wraz z częścią teoretyczną zostały przedstawione na 176 stronach. Praca doktorska ma klasyczny układ, w którym wyodrębniono część teoretyczną i eksperymentalną, a łącznie, dyskusja treści pracy została podzielona pomiędzy sześć rozdziałów. Są to takie rozdziały jak: wstęp teoretyczny, cele badawcze, materiały i metody, wyniki, dyskusja ogólna i wnioski końcowe, dorobek naukowy. Ponadto, poza strukturą rozdziałów pracy doktorskiej, autorka zamieściła wykaz skrótów, streszczenie pracy doktorskiej, a także bibliografię (łącznie 169 pozycji).

Podjęta w pracy tematyka silnie wpisuje się w aktualne trendy badawcze ukierunkowane na wyjaśnienie złożonych procesów typowych dla rozwoju takich istotnych schorzeń jak nowotwory, schorzenia neurodegeneracyjne czy zapalne występujące powszechnie w populacji. Niewątpliwie, szczególną rolę w tych schorzeniach odgrywają procesy, które wpływają na równowagę funkcjonowania komórek budujących organizmy. Zaburzając homeostazę oksydacyjno-redukcyjną i energetyczną mogą uruchamiać szlaki metaboliczne właściwe dla apoptozy komórek czy indukować różne procesy patologiczne. W ostatnich latach, dzięki szybkiemu rozwojowi metabolomiki i różnorodnych technik instrumentalnych, tego typu procesy jesteśmy w stanie efektywnie i skutecznie analizować uzyskując specyficzne sygnały chemiczne,

tj., wykazując obecność w badanych próbkach określonych związków chemicznych, które następnie można powiązać z obserwowanym efektem. Poszukiwanie charakterystycznych związków chemicznych, tzw. biomarkerów, daje nam ciekawą alternatywę dla klasycznych metod diagnostycznych rozmaitych schorzeń i szansę na kreowanie indywidualnych terapii schorzeń. Jednym z podstawowych podejść eksperymentalnych prowadzenia badań metabolomicznych są odpowiednio dobrane modele linii komórkowych, w których obserwuje się chemiczne odpowiedzi wywołane na skutek działania danego czynnika.

W swojej pracy, doktorantka szczegółowo przebadła wpływ kurkuminy, metforminy oraz hesperedyny na metabolizm, stres oksydacyjny w trzech modelach komórkowych (HEK-293, COS-7 i SW-982), a także poszukiwała odpowiedzi na pytanie czy wpływają na apoptozę komórek. W badaniach wykorzystano jako technikę analityczną protonowy rezonans magnetyczny, a także wybrane testy biologiczne oraz cytometrię przepływową. Uzyskane w trakcie prowadzonych eksperymentów wyniki analizowano stosując klasyczne podejścia chemometryczne takie jak analiza głównych składowych (PCA) czy dyskryminacyjny wariant ortogonalnej metody częściowych najmniejszych kwadratów (OPLS-DA). Łącznie przeprowadzono trzy główne eksperymenty ukierunkowane odpowiednio na badanie stresu oksydacyjnego (linie komórkowe HEK-293 i COS-7), ocenę wpływu kurkuminy i metforminy na dwie wybrane linie komórek HEK-293 i SW-982, które miały odmienny stan biologiczny – nienowotworowe i nowotworowe oraz badanie procesu zapalnego symulującego reumatoidalne zapalenie stawów. W toku przeprowadzonych badań autorka pracy wykazała, że kurkumina, metformina i hesperedyna wykazują selektywny wpływ i zarazem działają odmiennie w zależności od rodzaju linii komórkowych i typu występującego w nich stresu – oksydacyjny lub zapalny. Te związki chemiczne wykazują również potencjał cytotoksyczny wobec komórek, w których zachodzi proces zapalny i nowotworowy, a jednocześnie posiadają zdolność chronienia zdrowych komórek. W eksperymentach prowadzonych na liniach komórkowych potwierdzono potencjał terapeutyczny tychże związków i wykazano ich pozytywne działanie w przypadku określonych procesów chorobowych. Z kolei, protonowy rezonans magnetyczny umożliwił badanie dynamiki ich metabolizmu poprzez profilowanie przestrzeni wewnątrz komórek i poza nimi.

We wstępie teoretycznym pracy doktorskiej, jej autorka przedstawiła główną ideę stresu oksydacyjnego podając definicję, a także mechanizmy jego indukowania w komórkach. Wskazuje ona na podłoże chemiczne stresu oksydacyjnego, który jest warunkowany zachwianiem równowagi redoks na skutek większej ilości reaktywnych form tlenu i azotu w stosunku właściwego potencjału przeciwutleniającego jaki komórki wykształciły w toku ewolucji. Wśród czynników wpływających na poziom wolnych rodników często wymienia się czynniki środowiskowe, a te ze względu na postępującą degradację środowiska i rosnące poziomy zanieczyszczeń w coraz większym stopniu negatywnie oddziałują na różne układy biologiczne i ekosystemy, a w konsekwencji zwiększają odsetek rozmaitych procesów chorobowych notowanych w populacji dzieci i dorosłych. Inną smutną konsekwencją ich długofalowego działania jest również silna interakcja z materiałem genetycznym komórek, co ostatecznie może skutkować uszkodzeniem materiału genetycznego i mutacjami, a ich skutkami będą już na stałe obciążone przyszłe pokolenia. A zatem istnieje bardzo silny związek pomiędzy występowaniem procesów oksydacyjnych, a teraźniejszym i przyszłym dobrostanem wszystkich organizmów

żywych. Autorka pracy zwraca również naszą uwagę na rolę stresu antyoksydacyjnego w powstawaniu i przebiegu stanów zapalnych w komórkach, wskazując na istotne szlaki biochemiczne, które są odpowiedzialne za ekspresję określonych genów i dalszą syntezę białek prozapalnych. Obok ewolucyjnie nabytych rozwiązań na poziomie komórkowym, opartych na mechanizmach enzymatycznych i nieenzymatycznych, ważnym wsparciem dla ograniczenia obecności wolnych rodników w komórkach są różne związki chemiczne wykazujące zdolności przeciwutleniające obecne w spożywanych naturalnych produktach lub dodatkowo suplementowanych. Stres oksydacyjny ma również istotne znaczenie w kształtowaniu procesów nowotworzenia komórek i ich wzmacniania na każdym z kluczowych etapów. Ponadto, wzmacnia odpowiedź autoimmunologiczną komórek i jest odpowiedzialny za utrzymywanie przewlekłego stanu zapalnego, co ma kluczowe znaczenie w patofizjologii reumatoidalnego zapalenia stawów. Mając na względzie chemiczne podłoże wielu chorób i procesów, które je indukują oraz obserwowane zaburzenia wewnętrznej homeostazy, analiza metabolomiczna ukierunkowana na ilościowe i jakościowe profilowanie związków chemicznych czy celowane poszukiwania niektórych z nich odgrywa coraz większe znaczenie. Analiza endogennych i egzogennych metabolitów jest zadaniem bardzo ambitnym z analitycznego punktu widzenia. Należy podkreślić, że analizy będące celem analiz ilościowych i jakościowych występują w bardzo złożonej matrycy biologicznej, a ich stężenia są na bardzo niskim poziomie. Te założenia w praktyce rodzą wiele trudności, z jakimi stykamy się już na etapie przygotowania i oczyszczania próbek, co często wymaga stosowania technik wstępnej izolacji wybranych grup związków chemicznych (frakcjonowanie) i rozważnego doboru technik analitycznych mając na względzie konieczność minimalizacji liczby etapów przygotowania próbek, aby w sposób wiarygodny uzyskać ilościową odpowiedź. Można zatem powiedzieć, że w przypadku badań metabolomicznych, skuteczność tego podejścia i jakość wyników zależy od wszystkich etapów postępowania analitycznego – począwszy od optymalnego zaplanowania eksperymentów, właściwego pobrania próbek, poprzez ich przygotowanie i analizę, modelowania uzyskanych danych i walidacji modeli, po interpretację wyników, wnioskowanie i biologiczną walidację. Doktorantka podkreśla znaczącą rolę protonowego rezonansu magnetycznego, jako techniki spektroskopowej umożliwiającej jednoczesną analizę wielu związków chemicznych, a także wymienia technikę chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. W tym miejscu należy podkreślić, że nie istnieje jedna uniwersalna technika instrumentalna, która pozwoli ilościowo i jakościowo oznaczyć wszystkie składniki próbki. Stąd, metabolomika jako nauka wykorzystuje w badaniach wiele technik spektroskopowych i separacyjnych, a ich dobór zależy przede wszystkim od podjętego problemu badawczego i wstępnej wiedzy na temat metabolitów potencjalnie występujących w próbce. Obok samych metod i procedur analitycznych, niezwykle istotne są również podejścia eksperymentalne *in vitro* uwzględniające odpowiednie modele wybranych linii komórkowych, które dostarczają relatywnie szybko cenne dane na temat stresu oksydacyjnego indukowanego chemicznie. W kolejnych podrozdziałach pracy doktorskiej, jej autorka opisuje mechanizm działania kurkuminy i metforminy jako związków o podwójnym działaniu – przeciwzapalnym i przeciwnowotworowym. Zwraca uwagę na własności przeciwutleniające kurkuminy jak i wielokierunkowe działanie przeciwzapalne, a także możliwość znaczącego zwiększenia biodostępności poprzez dozowanie kurkuminy wraz z piperyną. Następnie opisuje rolę hesperydyny, bioflawonoidu, naturalnie występującego w owocach cytrusowych,



w przeciwdziałaniu stanom zapalnym. Podobnie jak w przypadku kurkuminy, biodostępność hesperydyny można poprawić poprzez stosowanie odpowiednich nośników, np. nanocząstek lipidów czy kompleksów cyklodekstrynowych. Doniesienia literaturowe podkreślają również synergistyczne działanie hesperydyny w terapii skojarzonej. Kolejny podrozdział porusza zagadnienia badań omicznych, a także roli protonowego rezonansu magnetycznego czy spektrometrii mas, przy czym pierwszą z metod autorka pracy uznaje za najbardziej dogodną w przypadku analiz próbek, w których istnieje konieczność jednoczesnej analizy dużej liczby metabolitów bez konieczności ich uprzedniego rozdzielania czy znakowania. Z drugiej strony, w porównaniu do spektrometrii mas, czułość protonowego rezonansu magnetycznego niestety jest niższa. Odzwierciedleniem składu chemicznego próbki jest specyficzne dla niej widmo czyli sygnał instrumentalny, tzw. odcisk palca. Interpretacja i dalsze modelowanie sygnałów pochodzących z protonowego rezonansu magnetycznego wymagają odpowiedniego przygotowania, które wykorzystuje różne transformacje matematyczne mające na celu przede wszystkim poprawa stosunku sygnału do szumu (np. korekcja linii podstawowej), a także inne korekty czy normalizacje. Identyfikacja związków małowymiarowych w matrycach biologicznych niewątpliwie stanowi duże wyzwanie analityczne i wymaga integracji wiedzy z odpowiednich baz danych. W niektórych sytuacjach, gdy identyfikacja metabolitów jest niejednoznaczna, należy sięgnąć po komplementarne techniki, np. dwuwymiarowy wariant rezonansu magnetycznego.

W drugim rozdziale pracy, autorka przedstawia główny cel badawczy swojego doktoratu oraz trzy cele szczegółowe. Głównym celem badań była ocena wpływu stresu oksydacyjnego i ocena działania kurkuminy, metforminy oraz hesperydyny, wykazujących potencjał przeciwutleniający i przeciwzapalny na metabolizm wybranych typów komórek ssaczych, w modelu *in vitro*. Z kolei przyjęte cele szczegółowe obejmują zaplanowane eksperymenty z uwzględnieniem wybranych linii komórkowych docelowo umożliwiających pozyskanie odpowiedzi biologicznej układów i ocenę ich reakcji na działanie określonych czynników.

Trzeci rozdział pracy doktorskiej został poświęcony scharakteryzowaniu użytych w badaniach materiałów i metod. W szczególności, szerzej omówiono trzy typy linii komórkowych, przedstawiono w formie tabelarycznej zestaw odczynników chemicznych oraz związków wzorcowych używanych w trakcie eksperymentów, wskazując ich producentów i numery katalogowe. Następnie opisano zaplanowane eksperymenty, wskazano czemu mają one służyć, a tam gdzie to było konieczne uzasadniono użycie dodatkowych testów. W Tabeli 2 systematycznie zebrano warunki poszczególnych hodowli komórkowych, w tym poszczególne najważniejsze informacje. W kolejnych podrozdziałach znajdujemy szczegółowe informacje na temat przygotowania roztworów liofilizowanego białka TNF- $\alpha$ , odpowiedniej preparatyki komórek do testów wyznaczania aktywności biologicznej, stosowanych testów (MTT – do oceny żywotności komórek, DCF-DA – do pomiaru poziomu stresu oksydacyjnego) i sposobu analizy apoptozy za pomocą cytometrii przepływowej. Następnie opisano główne kroki analiz profili metabolitów uwzględniając przygotowanie próbek do analizy, ich przechowywanie, ekstrakcji metabolitów i dalszej analizy ekstraktów na podstawie widm protonowego rezonansu magnetycznego wspartej identyfikacją metabolitów zaimplementowaną w oprogramowaniu Chenomx (wersja 8.4) i bazy *Human Metabolome Database*. Uzyskane w trakcie eksperymentów



dane i widma były przedmiotem analiz statystycznych i bioinformatycznych po uprzednim wstępnym przygotowaniu danych.

Czwarty rozdział pracy doktorskiej przedstawia wyniki badań z przeprowadzanych eksperymentów wraz z obszerną ich dyskusją. W szczególności autorka pracy omówiła zaobserwowane efekty i zinterpretowała je w oparciu o dostępne doniesienia literaturowe. W podrozdziale 4.1.3.3 dokonano syntezy wniosków płynących z użycia modeli linii komórkowych HEK-293 i COS-7 i badań stresu oksydacyjnego indukowanego nadtlaniem wodoru na metabolizm tychże komórek. Poczynione obserwacje w trakcie eksperymentu są zgodne z danymi literaturowymi. W dalszej części rozdziału znajdujemy omówienie zmian, które wynikają z obecności kurkuminy i metforminy w komórkach nowotworowych (SW-982) i embrionalnych (HEK-293).

W piątym rozdziale pracy, doktorantka przeprowadza ogólną dyskusję wyników oraz formułuje końcowe wnioski. Ogólnie można stwierdzić, że uzyskane wyniki badań i ich interpretacja są spójne i pozwoliły osiągnąć w pełni zamierzony cel główny i cele szczegółowe. Wnioski mają faktycznie charakter poznawczy, a przyjęta metodologia badań może być postrzegana jako oryginalne rozwiązania problemu badawczego.

W ostatnim, szóstym rozdziale pracy znajdujemy informacje na temat dorobku naukowego Pani mgr inż. Moniki Sapety-Nowińskiej. Obejmuje on trzy opublikowane artykuły, a także trzy kolejne, które aktualnie są w recenzji. Doktorantka uczestniczyła w ośmiu konferencjach naukowych, na których przedstawiła wyniki swoich badań. Ponadto, była zaangażowana w realizację zadań ujętych w planie badawczym projektu naukowego Narodowego Centrum Nauki (jedenasta edycja programu Sonata Bis).

Niewątpliwie, zaplanowane i wykonane w ramach pracy doktorskiej badania wymagały wiele wysiłku i ogromnego zaangażowania o czym świadczy złożoność prowadzonych eksperymentów, uwzględnienie różnych czynników, wymagająca praca laboratoryjna i analityczna oraz szeroka wiedza w zakresie interpretacji widm protonowego rezonansu magnetycznego oraz modelowania wielowymiarowych danych. Widać bardzo wyraźnie interdyscyplinarność i synergiczny efekt użycia różnych technik w ogólnym schemacie postępowania. Dużym atutem pracy są wykonane bardzo profesjonalne ilustracje i schematy, które znacznie ułatwiają zrozumienie poszczególnych zagadnień i mocno wspierają dyskusję wyników.

Po zapoznaniu się z pracą doktorską, chciałem wskazać kilka wątków, gdyż w mojej opinii wymagają one nieco głębszego rozważenia i dodatkowych wyjaśnień, których chętnie wysłucham i przedyskutuję z doktorantką podczas publicznej obrony. Poniżej zamieszczam ich listę.

- 1) Strona 12 (wykaz skrótów stosowanych w pracy doktorskiej): w przypadku akronimu OPLS-DA, który wynika wprost z angielskiej nazwy metody – *orthogonal partial least squares discriminant analysis* – odpowiednia polska nazwa wskazująca ideę działania metody to ortogonalna metoda najmniejszych kwadratów w wariacie dyskryminacyjnym albo dyskryminacyjny wariant ortogonalnej metody częściowych najmniejszych kwadratów.
- 2) Strona 49: brakuje szczegółowej informacji jakie urządzenie lub urządzenia zostały użyte do inkubacji i hodowli linii komórkowych. W jaki sposób dochowano rygoru sterylności? Podany



został jedynie poziom CO<sub>2</sub> i temperatura. W jakim zakresie te dwa parametry były utrzymywane na stałym poziomie w trakcie hodowli linii komórkowych? Co z przypadku różnej zawartości tlenu w atmosferze?

- 3) Tabela 1: sformułowanie „wysoka glukoza” wymaga ponownego przemyślenia. W przypadku kurkuminy, metforminy i hesperydyny istotne byłoby wykazanie w tabeli 1 również stopnia ich czystości bez konieczności poszukiwania tej informacji na stronach producenta. Określenie „kit” jest przyjętym sformułowaniem, głównie wśród biologów, na specjalne zestawy odczynników i materiałów wykorzystywanych w określonych typach analiz, niemniej jednak jest ono bardzo potoczne i zasługuje na bardziej profesjonalny odpowiednik w języku polskim i zarazem adekwatny do zasadniczej aplikacyjnej roli tego typu zestawów.
- 4) Strona 54: sformułowanie „metabolit istotnie zmieniony pod wpływem stresu oksydacyjnego” w kontekście testowania hipotez statystycznych jest niewłaściwe.
- 5) Strona 55: proszę o przedyskutowanie i zaproponowanie optymalnego sposobu przygotowania roztworów badanych wybranych związków stosując zakupione wzorce z uwzględnieniem popełnianych błędów pomiarowych oraz mając zarazem na względzie bardzo niskie docelowe stężenia roztworów np. 20 ng/mL i niewielkie objętości dozowane do hodowli komórkowych.
- 6) Tabela 2: moją ciekawość budzi możliwość absolutnego wyznaczenia liczby komórek wysiewanych do testów. Proszę o komentarz czy jest to w praktyce możliwe, a jeśli nie jaki jest spodziewany błąd oszacowania liczby komórek w poszczególnych dołkach?
- 7) W przypadku eksperymentów z wykorzystaniem linii komórkowych i ich analiz konieczne jest uwzględnienie niepewności odpowiedzi poprzez powtórzenie hodowli. Jak ten aspekt uwzględniono w przypadku prowadzonych eksperymentów?
- 8) Czasami w tekście pracy pojawia się niekonsekwencja podawania cyfr dziesiętnych – powinien być używany przecinek, a nie kropka (np. podrozdział 3.4.3).
- 9) Strona 64: czy względny wzrost lub spadek absorbancji faktycznie zależy liniowo od liczby komórek w grupie kontrolnej? Czy w przypadku DCF również mówimy o liniowej zależności? W jakim zakresie?
- 10) Strona 70, rys. 13: czy można analizować za pomocą protonowego rezonansu magnetycznego próbki umieszczone w probówkach typu Eppendorf?
- 11) Strona 71, podrozdział 3.5.2 – „(...) co umożliwiło oznaczenie metabolitów wewnątrzkomórkowych oraz zewnątrzkomórkowych.” – w mojej ocenie takie stwierdzenie sugeruje, że wszystkie metabolity obecne w próbce zostały zidentyfikowane. Czy faktycznie tak było? Czy chodzi o oznaczenie ilościowe czy jakościowe?
- 12) Strona 72: korekcja sygnałów instrumentalnych metodami COW lub icoshift ma na celu uzgodnienie pozycji odpowiadających sobie pików w sygnale wzorcowym i sygnale próbki. Mając na względzie cel tych metod, określenie „wyrównywanie” nie jest optymalne. Ponadto, dlaczego w sekcji 3.6.1 nie ma odnośników literaturowych do tychże metod? W jaki sposób był dobierany sygnał wzorcowy w procedurach nakładania? Jakie są potencjalne skutki niewłaściwego doboru sygnału wzorcowego?
- 13) Rys. 27: jaką część wariancji danych opisują poszczególne główne składowe?

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Moniki Sapety-Nowińskiej spełnia ustawowe i zwyczajowe wymogi stawiane pracom doktorskim w dyscyplinie nauki chemiczne. Praca doktorska omawia oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Doktorantka zdobyła szeroką wiedzę w dyscyplinie nauki chemiczne i przeprowadziła stosowne badania eksperymentalne. Temat badawczy jest aktualny i bardzo ważny. Sposób realizacji badań w oparciu o podejścia metabolomiczne zasługuje na uznanie. W mojej ocenie sfinalizowanie badań wymagało ogromnego wysiłku eksperymentalnego i bardzo dużego zaangażowania. W związku z powyższym, chciałbym prosić o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.

Niniejszym stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr inż. Moniki Sapety-Nowińskiej spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571) i wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Moniki Sapety-Nowińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Michał Danyłowśki