



Prof. dr hab. Michał Ciborowski
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Zakład Biochemii Lekarskiej

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Sapety-Nowińskiej pt.:
*„Modulacja metabolizmu komórkowego przez kurkuminę, metforminę i hesperydynę
w modelach in vitro: stresu oksydacyjnego, nowotworowym i zapalnym”*
wykonanej w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej
pod kierunkiem prof. dr. hab. Piotra Młynarza (Promotor)
oraz w Zakładzie Podstaw Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
pod opieką dr Katarzyny Gębczak (Promotor pomocniczy).

W badaniach będących przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej wykorzystane zostały różne modele komórkowe *in vitro* do oceny właściwości antyoksydacyjnych i przeciwzapalnych takich substancji jak kurkumina, metofrmina i hisperydyna. Stres oksydacyjny i przewlekły stan zapalny, wynikające z zaburzeń homeostazy redoks (nadmiar reaktywnych form tlenu (ROS) czy azotu) oraz aktywacji cytokin prozapalnych (np. TNF- α), odgrywają istotną rolę w patogenezie wielu chorób przewlekłych. Mogą one negatywnie wpływać na komórki poprzez swoje destrukcyjne działanie na makrocząsteczki (m.in. DNA, białka czy lipidy), co może prowadzić do zaburzenia różnych procesów biochemicznych, a w konsekwencji wpływać na metabolizm komórkowy, a nawet kierować je na drogę kancerogenezy. Oprócz chorób nowotworowych przewlekły stres oksydacyjny i stan zapalny przyczyniają się m.in. do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, zapalnych (np.: reumatoidalne zapalenie stawów, RZS) czy zaburzeń metabolicznych. Biorąc pod uwagę powyższe, wybór linii komórkowych wykorzystanych w przeprowadzonych badaniach uważam za trafny i dobrze uzasadniony naukowo. Komórki HEK-293 to stabilna linia embrionalna reprezentująca komórki prawidłowe podatne na stres oksydacyjny. Linia COS-7 to komórki o fenotypie przednowotworowym; a SW-982 to linia mięsaka maziówkowego, często wykorzystywana w badaniach *in vitro* nad nowotworami tkanek miękkich, ale po indukcji TNF- α stosowana też jako model zapalny RZS. Taki dobór pozwala na ocenę potencjału badanych związków w ochronie przed stresem oksydacyjnym i stanem zapalnym komórek będących w różnym stanie (pato)fizjologicznym.

Oceniana rozprawa liczy 191 stron i ma typowy układ obejmujący cztery główne rozdziały: wstęp teoretyczny, materiały i metody, wyniki oraz dyskusję i wnioski. Ponadto na początku rozprawy umieszczone zostały: spis treści, wykaz skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim; a na końcu dorobek naukowy doktorantki i bibliografia.

Wstęp teoretyczny rozprawy zawiera wszystkie zagadnienia istotne z punktu widzenia tematyki badań. Autorka definiuje stres oksydacyjny oraz opisuje jego rolę w rozwoju stanu zapalnego, procesie nowotworzenia oraz patofizjologii RZS. W tej części wstępu dodany jest też podrozdział poświęcony metabolomice i jej znaczeniu w badaniach nad stresem oksydacyjnym (1.1.4). W mojej ocenie zawarte w tym podrozdziale informacje o technikach analitycznych i rodzajach badań metabolomicznych bardziej pasują do podrozdziału 1.4, który jest poświęcony metabolomice. Natomiast pozostałe informacje odnośnie metabolitów i szlaków metabolicznych, które są wskazywane jako zaburzone w związku z występowaniem stresu oksydacyjnego, umieściłbym po rozdziale poświęconym badaniom na komórkach w kontekście stresu oksydacyjnego. W dalszej części wstępu scharakteryzowane są badane substancje oraz opisane są mechanizmy ich działania m.in. przeciwnowotworowego czy przeciwzapalnego, które ponadto przedstawione są na trzech czytelnych rysunkach. Z tytułu wspomnianego już wcześniej podrozdziału 1.4 usunąłbym zwrot „nauki omiczne”, gdyż jest on w całości poświęcony metabolomice. W podrozdziale tym, w sposób zrozumiały, przedstawione są aspekty techniczne spektroskopii protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), włączając opracowanie danych spektralnych i identyfikację związków w badaniach metabolomicznych. Informacje zebrane we wstępie pokazują, że Pani mgr inż. Monika Sapeta-Nowińska bardzo dobrze przygotowała się do realizacji swoich badań.

Odrębny rozdział stanowi jasno sprecyzowany cel pracy, do realizacji którego prowadzą trzy cele szczegółowe, a każdy z nich koresponduje z odpowiednim eksperymentem biologicznym. Pierwszy to ocena różnic w mechanizmach adaptacyjnych i odpornościowych będących odpowiedzią komórek prawidłowych i nowotworowych (COS-7) na stres oksydacyjny. Drugi to ocena wpływu kurkuminy i metforminy na metabolizm komórek prawidłowych i nowotworowych (SW-982) w warunkach normalnych oraz podczas stresu oksydacyjnego, a trzeci to ocena wpływu w/w związków oraz hesperydyny na modulację odpowiedzi zapalnej w modelu komórkowym RZS.

Rozdział „Materiały i metody” obejmuje 30 stron maszynopisu. Na jego początku przedstawiona została charakterystyka wszystkich zastosowanych przez Doktorantkę linii komórkowych, wraz z uzasadnieniem ich wyboru do realizacji badań. Ponadto, w rozdziale tym zostały szczegółowo opisane trzy eksperymenty na komórkach oraz zastosowane metody pomiarowe: ocena żywotności komórek i indukcji apoptozy, pomiar poziomu ROS oraz badania metabolomiczne NMR. Na uwagę zasługuje różnorodność metod pomiarowych zastosowanych przez Doktorantkę: oznaczenia spektrofotometryczne, fluorescencyjne, cytometryczne czy NMR. Cennym uzupełnieniem tej części rozdziału jest też lista stosowanych odczynników (wraz z informacją o producencie i numerze katalogowym); szczegółowe zestawienie warunków, w jakich były prowadzone hodowle komórkowe oraz instrukcje przygotowania kluczowych roztworów i komórek do testów. Wszystkie opisy wykonanych eksperymentów i zastosowanych metod są bardzo precyzyjne, co pozwala na ich odtworzenie, w razie potrzeby. Świadczy to o dojrzałości naukowej Pani mgr Sapety-Nowińskiej. Mam pytanie do tej części rozprawy dotyczące jednowymiarowej analizy statystycznej. Zgodnie z opisem metod po ocenie normalności rozkładu za pomocą testu Shapiro-Wilka, stosowano test t-Studenta (dla danych o rozkładzie normalnym) lub test U Manna-Whitney’a (dla danych niespełniających kryteriów normalności). W związku z niewielką liczbą powtórzeń, co jest typowe dla badań na hodowlach komórkowych, można założyć, że warunek spełniania kryterium normalności rozkładu nie jest spełniony i zastosować testy nieparametryczne. Co prawda test Shapiro-Wilka można stosować do oceny normalności rozkładu nawet dla bardzo małych prób, ale większa próba pozwala uzyskać bardziej wiarygodne wyniki. Czy w związku z tym rozważyła Pani możliwość zastosowania testu U Manna-Whitney’a we wszystkich porównaniach? Jaki był odsetek porównań, w których kryterium normalności rozkładu było spełnione? Ponadto w przypadku badań wielkoskalowych, do jakich należy metabolomika, uzyskiwane wartości p są korygowane, by zmniejszyć ryzyko fałszywych odkryć związanych z wielokrotnym testowaniem. Czy przeprowadzała Pani taką korektę? Rozdział 3.6.2 zatytułowany jest „Analiza danych wielowymiarowych”. Rozumiem, że dane metabolomiczne są co najmniej dwuwymiarowe, ale chyba miała tu Pani na myśli wielowymiarową analizę danych.

O ogromnej pracy wykonanej przez Doktorantkę świadczą nie tylko przeprowadzone przez nią liczne i różnorodne eksperymenty i pomiary, ale także ilość uzyskanych wyników. Są one przedstawione w rozdziale czwartym, który ma ponad 90 stron i zawiera prawie 40 rysunków. Należy podkreślić, że wiele z nich składa się z paneli, a ponadto część danych zebrana jest w materiałach uzupełniających dostarczonych wraz z rozprawą na płycie CD, co świadczy o imponującej ilości uzyskanych wyników badań. Mam pytanie odnośnie prezentacji danych metabolomicznych. Zgodnie z tytułem, oś Y przedstawia relatywne stężenie. Czy może Pani wyjaśnić, co to oznacza? Czy wartości

te mają jakąś jednostkę? Rozdział „Wyniki” podzielony jest na trzy podrozdziały, każdy dedykowany jednemu z celów szczegółowych. Podrozdziały te zakończone są dyskusją wyników przedstawionych w danym podrozdziale. Doktorantka szczegółowo omawia w nich uzyskane przez siebie wyniki, zachowując ciągłość przyczynowo-skutkową przeprowadzonych badań. Krytycznie dyskutuje rezultaty swoich badań w kontekście wyników uzyskanych przez innych badaczy. Przeprowadzona dyskusja wyników pokazuje, że Pani mgr Monika Sapeta-Nowińska ma szeroką wiedzę w zakresie procesów biochemicznych i zmian w poziomie metabolitów związanych z występowaniem stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego czy procesów nowotworzenia na poziomie komórkowym. Jest również dokładnie zaznajomiona z literaturą naukową z obszaru swoich badań oraz umiejętnie interpretuje wyniki badań własnych.

Kolejny rozdział zatytułowany jest „Dyskusja ogólna i wnioski końcowe”. Po zapoznaniu się z jego treścią stwierdzam, że poprzedni rozdział mógłby być zatytułowany „Wyniki i dyskusja”, a ten „Wnioski”. Taka forma podziału publikacji naukowej jest preferowana przez wiele wydawnictw naukowych, a w tym przypadku bardziej by odzwierciedlała treści zawarte w tych dwóch rozdziałach. W rozdziale tym wyniki badań przedstawione są w formie skondensowanej, z podziałem na poszczególne eksperymenty, odpowiadające celom szczegółowym. A do tego przedstawione są wyciągnięte z badań wnioski, które odpowiadają na postawione cele badawcze. Doktorantka wykazała, że kurkumina czy metformina, w zależności od sytuacji pato(fizjologicznej), działa ochronnie w stosunku do komórek prawidłowych i cytotoksycznie wobec komórek nowotworowych. Wszystkie badane związki wykazują pozytywne działanie farmakologiczne w modelu zapalnym RZS.

Przedostatnia część rozprawy zawiera dorobek naukowy Doktorantki. Pani magister jest współautorką 6 publikacji, z których dwie są w trakcie recenzji lub przygotowania. Ponadto jest współautorką prawie 10 doniesień zjazdowych, z których większość przedstawiała w formie prezentacji ustnej. Za swoją działalność naukową uzyskała stypendium Dziekana Szkoły Doktorskiej oraz otrzymała dwa wyróżnienia za prezentacje na konferencjach naukowych. Była też stypendystką w projekcie SONATA BIS 11. Uważam, że osiągnięcia naukowe Doktorantki są bardzo dobre jak na obecny etap pracy naukowej.

Bibliografia, którą posiłkowała się Doktorantka, obejmuje blisko 170 pozycji, w większości anglojęzycznych, z których prawie 60% to publikacje z ostatnich 10 lat. Drobnym niedociągnięciem jest brak ujednoliconego formatu spisu literatury.

Z poziomu recenzenta nie mogę też pominąć innych błędów, które zauważyłem. Niektóre pozycje na tej liście, jak np.: *heatmap* czy β -katenina to nie są skróty, a NO* to rodnik tlenu azotu. Zarówno w liście skrótów, jak i w innych częściach rozprawy w wielu miejscach nazwy łacińsko- czy anglojęzyczne są napisane kursywą. Cytowania literatury przedstawione w jednym nawiasie, z przedziałem w przypadku cytowania ciągiem większej liczby prac, np. [10-13]; wyglądałyby bardziej estetycznie niż każda pozycja w oddzielnym nawiasie, jak to jest np. na stronie 20. Ponadto, na stronie 25 napisane jest, że metabolomika jest jedną z najmłodszych dziedzin spośród komponentów biologii systemowej, otóż jest ona najmłodszą dziedziną kaskady omiczej. Powyższe niedociągnięcia i błędy edytorskie nie podważają wartości merytorycznej przedstawionej pracy i przeprowadzonych badań. A należy podkreślić, że rysunki i schematy zawarte w rozprawie przygotowane zostały z dużą starannością i dodają jej walorów estetycznych.

Podsumowując, w ocenianej rozprawie doktorskiej przedstawione są interdyscyplinarne badania obejmujące badania na hodowlach komórkowych z wykorzystaniem m.in. nowoczesnych metod badawczych, takich jak metabolomika przy pomocy NMR czy cytometria przepływowa. Uzyskane wyniki poszerzają naszą wiedzę nt. działania kurkuminy, metforminy i hesperydyny na metabolizm, stres oksydacyjny oraz odpowiedź zapalną w komórkowych modelach *in vitro*.

Biorąc pod uwagę całość rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Moniki Sapety-Nowińskiej stwierdzam, iż spełnia ona wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571). W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr inż. Moniki Sapety-Nowińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, w związku z tym, iż przeprowadzone badania są innowacyjne i interdyscyplinarne, a uzyskane wyniki mają dużą wartość poznawczą i potencjał translacyjny, przedkładam Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Białystok, dn. 04.02.2026 r.