

Dr hab. Maja Grabacka  
Wydział Technologii Żywności  
Uniwersytet Rolniczy  
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej Pana lek. med. Jerzego Maksymowicza  
zatytułowanej: „Ocena interakcji genotoksycznych szczepów *E. coli* z nabłonkiem jelita  
grubego i wpływu pektyn na aktywność przeciwnowotworową irynotekanu”  
wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. n. med. Kamili Środy-Pomianek**

Podjmując się funkcji recenzenta w przewodzie doktorskim (na podstawie uchwały nr 664/X/2022 Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z dn. 27.10.2022), przygotowałam ocenę rozprawy, biorąc pod uwagę oprócz strony formalnej, trzy aspekty: oryginalność problemu naukowego i sposób jego rozwiązania, ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta w reprezentowanej dyscyplinie naukowej, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, zgodnie z art. 13 ust. 1 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

### 1. Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa składa się z krótkiego, opatrzonego bibliografią (29 pozycji) wstępu, w zwięzły i klarowny sposób wprowadzającego czytelnika w poruszaną problematykę. W osobnym rozdziale sformułowane zostały cele projektu badawczego, w ramach którego zrealizowana została praca doktorska. Kolejny rozdział stanowią „Materiały i metody”, w którym Autor wymienia i bardzo zdawkowo opisuje zastosowane metody badawcze. W części tej powinien znaleźć się szczegółowy opis wyłącznie tych procedur doświadczalnych, które Autor samodzielnie wykonał, zwłaszcza, że nie ma tutaj limitu miejsca, z jakim często spotykamy się w publikacjach. Alternatywnie, można było wymienić wykonane przez Autora doświadczenia i odesłać czytelnika do opisu metod w załączonych publikacjach. Następnie, na 47 stronach Autor zamieszcza przedruki publikacji stanowiących podstawę rozprawy:

- „*Newly Obtained Apple Pectin as an Adjunct to Irinotecan Therapy of Colorectal Cancer Reducing E. coli Adherence and  $\beta$ -Glucuronidase Activity*” Palko-Łabuz, A.; Maksymowicz, J.; Sobieszkańska, B.; Wikiera, A.; Skonieczna, M.; Wesołowska, O.; Środa-Pomianek, K. (2021) *Cancers* 13: 2952.

- „*The Use of Endo-Cellulase and Endo-Xylanase for the Extraction of Apple Pectins as Factors Modifying Their Anticancer Properties and Affecting Their Synergy with the Active Form of Irinotecan*” Maksymowicz, J.; Palko-Łabuz, A.; Sobieszcańska, B.; Chmielarz, M.; Ferens-Sieczkowska, M.; Skonieczna, M.; Wikiera, A.; Wesołowska, O.; Środa-Pomianek, K. (2022) *Pharmaceuticals* 15: 632.
- “*Biegunka indukowana chemioterapią – patofizjologia, obecne i przyszłe kierunki leczenia*”. Maksymowicz, J.; Środa-Pomianek, K. (2021) *Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce: nauki medyczne i nauki o zdrowiu – choroby* 2021, 62-67.

Należy podkreślić, że publikacje doświadczalne wchodzące w skład rozprawy mają wysoki współczynnik wpływu oraz punktację przyznaną przez MEiN (IF 5,215; 100 pkt oraz IF 6,575; 140 pkt).

W kilku miejscach w rozprawie (str. 15, 16, 67), omyłkowo chyba, pojawia się inaczej sformułowany tytuł publikacji w *Cancers* (2021): „*Newly obtained apple pectin as an adjunct to irinotecan therapy, presumptively reducing its side effects via influence on colonic E. coli  $\beta$ -glucuronidase*”. Ostatnią część rozprawy stanowi rozdział “Podsumowanie i wnioski”, w którym Autor w punktach zebrał obserwacje, które wcześniej zamieszczono w publikacjach doświadczalnych. Pojawiają się tutaj nieliczne błędy interpunkcyjne lub sformułowania nieco żargonowe, np. skrót „ROS” oznaczającym reaktywne formy tlenu, choć w języku polskim stosuje się raczej „RFT”. W części tej zabrakło bardziej uogólnionych wniosków porządkujących poczynione obserwacje, dotyczących na przykład zależności siły działania preparatów pektyn od różnic w ich budowie chemicznej oraz relacji pomiędzy wrażliwością poszczególnych linii nowotworowych na konkretne pektyny, a stopniem ich złośliwości. Do rozprawy dołączono również oświadczenia Współautorów prac doświadczalnych określające bardzo ogólnikowo ich wkład w powstanie tych publikacji oraz zgody Współautorów na użycie publikacji w przewodzie doktorskim.

## 2. Ocena oryginalności podjętego problemu badawczego i sposobu jego rozwiązania

Tendencja wzrostowa zachorowalności na raka jelita grubego oraz częstość jego występowania (trzecie miejsce wśród najczęściej występujących nowotworów na świecie), stawiają ten typ nowotworu w czołówce potencjalnie śmiertelnych chorób niezakaźnych oraz stwarzają poważny problem dla systemów ochrony zdrowia w wielu krajach. Dobór metod leczenia zależy od wielu czynników, m.in. rodzaju, stanu zaawansowania i lokalizacji zmian nowotworowych, jednak najczęściej stosowane są rozwiązania chirurgiczne, radioterapia oraz chemioterapia, w tym irynotekan. Irynotekan (CPT-11) jest pochodną kamptotecyny, a jego aktywny metabolit SN-38 poprzez blokowanie działania topoisomerazy I, enzymu aktywnego podczas replikacji DNA, wywołuje pęknięcia nici DNA w dzielących się komórkach i w konsekwencji ich śmierć. SN-38 trafia z krwią do wątroby, gdzie ulega glukuronidacji przez UDP-

glukuronozylotransferazy i jako SN-38G wydzielany jest z żółcią do przewodu pokarmowego. Tam jednak może następować przekształcenie przez  $\beta$ -glukuronidazy bakteryjne z powrotem do SN-38, co wywołuje uszkodzenie śluzówki jelita i przyczynia się do rozwoju biegunki zależnej od chemioterapii (CID).

W swojej pracy doktorskiej Pan Jerzy Maksymowicz zaproponował wykorzystanie preparatów izolowanych enzymatycznie pektyn jabłkowych w potrójnej roli: (i) jako czynnika synergistycznie wzmacniającego cytotoksyczne działanie SN-38 na komórki raka jelita grubego; (ii) jako czynnika ograniczającego adhezję potencjalnie patogennych szczepów *E. coli*, które mogą nasilać biegunkę wywołaną przez chemioterapię; oraz (iii) jako inhibitora bakteryjnych  $\beta$ -glukuronidaz działającego w jelicie. Jest to pomysł bardzo nowatorski i ważny z perspektywy klinicznej, ponieważ potwierdzenie synergizmu działania preparatów pektynowych z irynotekaniem w warunkach *in vivo* mogłoby stanowić impuls do przetestowania obniżonych dawek tego leku w formule skojarzonej z pektynami, co prawdopodobnie przełożyłoby się na ograniczenie skutków ubocznych chemioterapii, w tym biegunek. Działanie hamujące pektyn na bakteryjne  $\beta$ -glukuronidazy powinno ograniczyć wsteczną konwersję metabolitu substancji czynnej irynotekanu, ograniczając jego negatywne działanie na zdrową śluzówkę jelita. Pektyny jako naturalny składnik błonnika pokarmowego dodatkowo pozytywnie wpływają na stan śluzówki przewodu pokarmowego, mogą też pełnić rolę prebiotyku, wspomagając rozwój korzystnej mikrobioty.

Sposób realizacji celów badawczych, jakimi były: ocena działania cytotoksycznego pektyn enzymatycznie izolowanych z wyłoków jabłkowych oraz potencjalnego ich współdziałania z SN-38; określenie mechanizmu cytotoksycznego działania pektyn; ocena wpływu pektyn na aktywność bakteryjnej  $\beta$ -glukuronidazy oraz adhezję bakterii do powierzchni komórek nowotworowych, nie nosi cech nowatorstwa: wykorzystane zostały ludzkie linie nowotworowe w typowej hodowli dwuwymiarowej, nie przeprowadzono też analizy aktywności żadnych wewnątrzkomórkowych ścieżek transdukcji sygnału. Ważne jednak, że doświadczenia wykonano na kilku liniach komórkowych, aby uzyskać bardziej spójny obraz skutków biologicznych działania preparatów pektyn. Szkoda, że Autor nie zaplanował analiz, choćby tylko dla wybranych warunków doświadczalnych, z użyciem hodowli trójwymiarowych, na przykład sferoidów, które nie są technicznie trudne do uzyskania, a lepiej modelują sytuację komórek w guzie nowotworowym.

W kontekście wymienionych w rozprawie celów dziwi sformułowanie pierwszej części tytułu rozprawy: „Ocena interakcji genotoksycznych szczepów *E. coli* z nabłonkiem jelita grubego...”. Po pierwsze nie wykorzystywano prawidłowego nabłonka jelita grubego, a interakcja (adhezja) bakterii badana była na tylko komórkach linii rakowych, które pod wieloma względami różnią

się od nabłonka prawidłowego (na co też Autorzy zwracają uwagę w publikacjach będących częścią rozprawy). Po drugie, wykorzystane w pracy szczepy bakterii *Escherichia coli* (AIEC LF82 oraz laboratoryjny niepatogenny szczep K12) nie wykazują cech genotoksyczności. Szczep bakterii *E. coli* LF82 wykazuje fenotyp inwazyjno-adhezyjny (AIEC, ang. adhesive-invasive *E. coli*), ale nie genotoksyczny i nie stwierdzono u niego jak do tej pory produkcji genotoksyn, czyli związków powodujących uszkodzenia DNA, takich jak pęknięcia jednej lub obu nici. Szczepy *E. coli* wykazujące takie działanie nazywane są genotoksycznymi i produkują m.in. toksynę peptydowo-poliketydową kolibaktynę, nie zostały one jednak użyte w pracy. W tekście rozprawy ani w publikacjach wchodzących w jej skład nigdzie nie pojawia się sformułowanie dotyczące genotoksyczności, nie ma też mowy o związku szczepów genotoksycznych z rakiem jelita grubego, choć taką korelację rzeczywiście opisano w wypadku kolibaktyny i bakterii *E. coli* z grupy filogenetycznej B2, które ją produkują [1]. Być może Autor używając określenia „genotoksyczny szczep” miał na myśli szczep bakterii produkujący

$\beta$ -glukuronidazę, rozkładającą glukuronid metabolitu irynotekanu (SN-38G) do formy aktywnej leku (SN-38), który sam w sobie działa genotoksycznie. Takie sformułowanie nie jest jednak właściwe, ponieważ  $\beta$ -glukuronidazy są powszechnie produkowane przez większość naturalnej mikrobioty zasiedlającej przewód pokarmowy człowieka uważanej za prawidłową, w tym przedstawiciele głównych grup taksonomicznych: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria* [2].

### 3. Ocena ogólnej wiedzy i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej

Niełatwo jest ocenić ogólną wiedzę Doktoranta w przypadku rozprawy opartej na publikacjach wieloautorskich, jednak można taką ocenę przeprowadzić na podstawie oświadczenia Pana Jerzego Maksymowicza z dn. 12.01.2023. Doktorant brał czynny udział w planowaniu oraz zajął się wykonaniem większości doświadczeń testujących cytotoksyczność badanych preparatów pektynowych, opracował również uzyskane dane i przygotował wykresy ilustrujące zebrane wyniki. Ponadto dokonał analizy źródeł literaturowych i na jej podstawie zaplanował eksperymenty sprawdzające wpływ pektyn na przebieg cyklu komórkowego, wywołanie stresu oksydacyjnego oraz apoptozy, a także potencjalną modulację stanu zapalnego. Na uwagę zwraca też samodzielne przeprowadzenie analizy współdziałania pektyn z aktywną formą irynitekanu i wykazanie synergizmu. Doktorant uczestniczył też w oznaczeniach aktywności bakteryjnej  $\beta$ -glukuronidazy oraz badaniu adhezji bakterii do powierzchni komórek, a także wykonał dokumentację fotograficzną preparatów mikroskopowych. Wiedza zdobyta w czasie studiowania literatury tematu pozwoliła również Panu Jerzemu Maksymowiczowi na współdecydowanie o ostatecznym kształcie publikacji, w tym na formułowanie wniosków

oraz odpowiedzi na uwagi redakcji. Powyższe dokonania świadczą o tym, że zdobył doświadczenie, umiejętności i wiedzę konieczną do prowadzenia samodzielnej pracy naukowej w przyszłości. Poniżej zamieszczam szczegółowe uwagi i komentarze odnośnie wyboru metod badawczych oraz interpretacji niektórych wyników.

### 3.1 Komentarze do metodyki

3.1.1. *Wybór modelu badawczego.* W pracach wykorzystano trzy linie komórkowe: HCT 116 – linia raka jelita grubego oraz Caco-2 i HT-29 – linie gruczolakoraków jelita grubego, spośród tych linii HCT 116 reprezentuje najbardziej zaawansowany nowotwór, o wysokim stopniu odróżnicowania, z dużym odsetkiem komórek macierzystych nowotworu (ang. cancer stem cells, CSCs) [3]. Komórki dwóch pozostałych linii można w warunkach laboratoryjnych zróżnicować do komórek przypominających prawidłowe enterocyty (Caco-2), lub komórki kubkowe (HT-29). Wybór takich, a nie innych linii komórkowych uzasadniono faktem, że często są wykorzystywane w badaniach, różnią się profilem mutacji oraz pochodzą od pacjentów różnej płci. Dziwi jednak fakt, że w uzasadnieniu pominięto informacje na temat statusu ekspresji genów i poziomu białek, które Autorzy uznali za kluczowe, czyli receptora Toll-podobnego 4 (TLR-4) oraz galektyny-3: linia HT-29 posiada wysoki poziom ekspresji zarówno TLR-4 jak galektyny-3; linia Caco-2 posiada bardzo niski, prawie niewykrywalny poziom TLR-4, ale dość wysoki poziom galektyny-3, a linia HCT 116 wykazuje bardzo niski poziom obu tych białek [4, 5].

Wybór linii komórkowych do doświadczeń z badaniem adhezji bakterii *E. coli* LF82 i K12 padł na linie HCT 116 oraz Caco-2, co Autorzy uzasadnili stwierdzając, że adhezja bakterii może wpływać na inicjację i progresję w przypadku raka jelita grubego (*Cancers*, 2021, str. 13, wiersz 2). Jest to prawda, jednak w takim razie logicznym wyborem byłaby hodowla prawidłowego ludzkiego nabłonka jelitowego (np. stosowana przez Autorów linia *fetal human colon epithelium*, FHC) lub hodowla komórek HT-29, która może być względnie łatwo zróżnicowana do komórek kubkowych produkujących mucynę [6]. Jest to ważne, ponieważ nabłonek jelitowy w warunkach fizjologicznych pokryty jest śluzem zawierającym m.in. mucynę, które mają wpływ na adhezję bakterii i chronią powierzchnię komórek przed kontaktem z patogennymi bakteriami, a mogą sprzyjać adhezji gatunków i szczepów pożytecznych.

3.1.2. *Analiza markerów stanu zapalnego.* W obu pracach doświadczalnych zdecydowano się na pomiar poziomu białek związanych ze stanem zapalnym: wewnątrzkomórkowego enzymu odpowiedzialnego za syntezę prostaglandyn – cyklooksygenazy 2 (COX-2) oraz cytokiny prozapalnej – interleukiny 6 (IL-6), natomiast w artykule opublikowanym w *Pharmaceuticals*

(2022) sprawdzano ponadto poziom receptora TLR-4 w liniach komórkowych raka jelita. Zainteresowanie Autorów stanem zapalnym jest naturalne, ponieważ wiadomo, że endo- i egzogenne czynniki prozapalne pełnią ważną, choć niejednoznaczną rolę w powstawaniu i progresji, ale również zwalczaniu raka jelita grubego. Dodatkowo enzym COX-2 odpowiada za poziom prostaglandyny PGE<sub>2</sub> w śluzówce jelita, która jest niezwykle ważna dla naturalnego procesu odnowy nabłonka, a także regeneracji jego uszkodzeń [7]. Stan zapalny jest również czynnikiem wpływającym na rozwój biegunek w czasie chemioterapii.

Powstaje jednak pytanie, czy badanie poziomu COX-2 i IL-6 akurat w komórkach rakowych jest zasadne, ponieważ za stan zapalny w jelicie odpowiadają zwykle głównie immunokompetentne komórki zasiedlające blaszkę właściwą śluzówki, m.in. makrofagi, neutrofile oraz komórki limfoidalne. Komórki nabłonkowe słabo reagują na prozapalne komponenty bakterii, takie jak lipopolisacharyd (LPS), z powodu niskiego poziomu ekspresji receptorów dla LPS, głównie TLR-4. Jest to naturalny mechanizm zabezpieczający przed zbyt łatwym wybuchem zapalenia podczas ciągłej ekspozycji na komponenty bakterii w niezwykle gęsto zasiedlonym przez mikrobiotę środowisku, jakim jest jelito grube. Z kolei komórki dendrytyczne i makrofagi patrolujące blaszkę właściwą, szybko i intensywnie reagują na bakterie i ich metabolity, które przedarły się przez ścisłą warstwę komórek nabłonkowych. Taka sytuacja ma miejsce w przypadku uszkodzenia i utraty szczelności śluzówki jelita podczas chemioterapii, kiedy komórki immunokompetentne blaszki właściwej mogą wejść w kontakt zarówno z LPS jak też pektynami, dlatego lepszym według mnie modelem badania przeciwzapalnego działania pektyn byłoby zastosowanie na przykład wybranej ludzkiej linii monocytarnej.

Kolejną sprawą jest nietypowy plan stymulowania komórek za pomocą LPS w celu wywołania stanu zapalnego: komórki inkubowane były 24 godziny w obecności LPS, a następnie dodawano preparaty pektyn na 48 godzin, po czym zbierano komórki i przygotowywano z nich lizaty. Reakcja w odpowiedzi na bodziec prozapalny jest z reguły bardzo szybka: po związaniu LPS z błonowym receptorem wewnątrzkomórkowe szlaki transdukcji sygnału (np. szlak prowadzący do aktywacji czynnika NFκB) są kaskadowo aktywowane w przeciągu kilkunastu - kilkudziesięciu minut po dodaniu LPS, co pozwala włączyć transkrypcję genów w kilka godzin, a docelowe białka efektorowe wytwarzane i wydzielane są w ciągu kolejnych kilkunastu godzin. Po związaniu LPS receptory błonowe (takie jak TLR-4, czy TLR-2) ulegają internalizacji i są wewnątrz komórki degradowane bądź redystrybuowane, a komórka przez jakiś czas jest mniej reaktywna na kolejne bodźce. Jednym słowem, dodanie pektyn po 24 godzinach od dodania LPS nie pozwala na sprawdzenie ich wpływu na kluczową i najbardziej dynamiczną fazę zapalenia. Z tego względu w typowym układzie doświadczalnym badany związek (tu na

przykład pektyna) dodawany jest do komórek na okres tzw. pre-inkubacji, a potem z kolei LPS i próbki analizowane są w wybranym czasie po jego podaniu, jednak zwykle znacznie krótszym niż 72 godziny. Zarówno w pracy opublikowanej w *Cancers* (2021) jak i *Pharmaceuticals* (2022) próbki zbierane były 72 godziny po dodaniu LPS, co mogło spowodować, że otrzymane wyniki są nie całkiem miarodajne.

Następny problem pojawia się w przypadku wyboru metody oznaczania ilościowego białek COX-2, IL-6 i TLR-4, jakim były testy ELISA. Testy ELISA (w tym te wykorzystane w pracy) są przeznaczone do pomiaru stężenia wybranego białka w płynach biologicznych takich jak surowica, osocze krwi, mocz, czy płyn pochodzący po odwirowaniu komórek. Zwykle nie są stosowane w przypadku lizatów komórkowych, jak to zostało przeprowadzone w obu pracach. Zaskakuje fakt, że IL-6, która jest typowym białkiem wydzielniczym, nie została oznaczona w płynie pochodzącym, ale właśnie w lizacie. Taki sposób analizy pomija całkiem pomiar ilości cytokiny wydzielonej do pożywki i powoduje trudne do oszacowania zaniżenie rzeczywistej produkcji IL-6. Ponadto białka takie jak TLR-4 czy galektyna-3, mogą występować w różnych kompartmentach komórkowych i znaczna ich frakcja jest związana z błonami. W trakcie przygotowania lizatu zwykle następuje etap wirowania, który pozwala oddzielić klarowny supernatant (próbkę) od osadu, w którym znajdują się fragmenty błon z uwieczonymi w nich białkami powierzchniowymi (np. TLR-4, czy Gal-3) lub białkami niektórych organelli. Natomiast jeżeli na płytkę do testu ELISA nakładany był lizat niewirowany (tzw. crude lysate), to z pewnością fragmenty błon z białkami zostały wymyte z płytki podczas płukania. Z powyższych powodów białka takie jak TLR-4 czy Gal-3 są szczególnie trudne do analizy ilościowej, a już na pewno ELISA nie jest w ich przypadku preferowaną metodą oznaczania. Jest również zaskakujące, że Autorzy posługujący się biegłą cytometrią przepływową (czemu dali wyraz wykorzystując tę technikę do badania apoptozy oraz cyklu komórkowego), nie zastosowali jej do oznaczenia ilościowego populacji komórek z powierzchniową ekspresją TLR-4 i Gal-3, jak również po wykonaniu permeabilizacji komórek detergentem można było sprawdzić wewnątrzkomórkową obecność tych białek. Alternatywnie, można w czasie lizy komórek wyodrębnić frakcję białek błonowych, frakcję białek cytoplazmatycznych lub jeszcze innych organelli i półilościowo oznaczyć wybrane białka metodą immunoblottingu.

3.1.3. *Dobór metod statystycznych.* Do analizy wyników doświadczeń zamieszczonych w opublikowanych pracach [*Cancers* (2021) i *Pharmaceuticals* (2022)] oraz badania różnic między średnimi użyto testu *t* Studenta. Test ten stosuje się do analizy różnic pomiędzy dwiema grupami (np. zabieg doświadczalny i kontrola), tutaj natomiast mamy do czynienia z kilkoma grupami doświadczalnymi (np. kontrola i różne rodzaje preparatów pektynowych), poddanymi

działaniu jeszcze kolejnych czynników (dodatek lub brak dodatku SN-38 czy też LPS). W takim przypadku należałoby zastosować raczej analizę wariancji jedno- lub dwuczynnikową w zależności od typu doświadczenia i pytania, na jakie to doświadczenie ma dać odpowiedź. ANOVA oraz zastosowanie odpowiednich testów *post-hoc* pozwala na uzyskanie o wiele większej ilości informacji z tych samych danych, niż testowanie poszczególnych par grup testem *t*, w tym nie tylko na wykrycie różnic w zmienności w obrębie i pomiędzy grupami doświadczalnymi, ale również na wykrycie interakcji pomiędzy czynnikami (komórki reagują inaczej na każdą z pektyn w obecności SN-38, a inaczej pod nieobecność tego czynnika) i potwierdzenie jej istotności statystycznej. W kontekście zainteresowania Autora synergizmem pomiędzy pektynami a SN-38 statystyczne potwierdzenie istnienia interakcji byłoby jak najbardziej uzasadnione.

### 3.2. Komentarze do opisu wyników

3.2.1. *Cytotoksyczne działanie pektyn oraz synergizm z SN-38.* W pracach doświadczalnych stanowiących trzon rozprawy doktorskiej testowano trzy preparaty pektyn ekstrahowanych enzymatycznie z wyłoków jabłkowych: (1) PC izolowany za pomocą celulazy, o masie cząsteczkowej 589 kDa i średniej zawartości cukrów obojętnych, (2) PX izolowany za pomocą ksylanazy, o masie cząsteczkowej 899 kDa i największej zawartości cukrów obojętnych oraz (3) PCX izolowany przy użyciu obu enzymów, o masie cząsteczkowej 419 kDa i najniższej zawartości cukrów obojętnych [8]. Wysokie masy cząsteczkowe i wysoka zawartość cukrów obojętnych świadczą o obecności rozgałęzionych frakcji ramnogalakturonianu I i II, oprócz podstawowej frakcji homogalakturonianu o różnym stopniu metylacji [8].

Zmniejszenie liczby żywych komórek w hodowlach poddanych działaniu preparatów pektyn podawanych samodzielnie lub razem z SN-38 jest dobrze udokumentowane, a w połączeniu z analizą dystrybucji komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego i potwierdzeniem występowania apoptozy dwiema niezależnymi metodami stanowi mocny dowód eksperymentalny na biologiczne działanie pektyn. Na uwagę zasługuje również analiza izobolograficzna wyników otrzymanych po zastosowaniu kilku stężeń preparatów pektyn w kombinacji z różnymi dawkami SN-38 oraz wyłonienie kombinacji stężeń preparatów pektyn wykazujących działanie synergistyczne z SN-38 podawanym w stężeniach poniżej wartości  $IC_{50}$  dla tego związku, czyli poniżej 7,5 - 10,3 nM, w zależności od linii komórkowej. Synergizmu działania nie wykazano pomiędzy SN-38, a komercyjnie dostępnym preparatem pektyn PectaSol-C, choć w przypadku tego preparatu testowano tylko jedną kombinację stężeń.

Stwierdzono ponadto, że preparat pektyn PX, o najwyższej masie cząsteczkowej oraz najwyższym udziale cukrów obojętnych, a więc prawdopodobnie najbogatszy we frakcje



ramnogalakturonianu I i II, był szczególnie skuteczny w kombinacji z SN-38 w przypadku linii HT-29, natomiast w przypadku linii HCT 116 i Caco-2 lepiej sprawdzał się preparat PCX, o najmniejszej masie cząsteczkowej i zawartości cukrów obojętnych. Niestety, preparat PC przetestowany został tylko na jednej linii, HCT 116, tym niemniej i w jego przypadku zademonstrowano działanie synergistyczne z SN-38.

3.2.2. *Stan zapalny.* Z powodu opisanych wyżej uwag do metodyki wykorzystanej do oznaczenia białek związanych ze stanem zapalnym, w mojej opinii uzyskane wyniki nie są do końca wiarygodne: na wykresach 8A, B i C w publikacji w *Pharmaceuticals* (2022) słupki pokazujące poziom COX-2, IL-6 i TLR-4 w komórkach HT-29 niestymulowanych LPS wskazują odpowiednio: około 40 pg/ml COX-2, około 70 pg/ml IL-6 i aż 40 ng/ml TLR-4, czyli ilość TLR-4 jest aż o trzy rzędy wielkości większa niż pozostałych białek! Wydaje się to nieprawdopodobne, ponieważ białek receptorowych w komórkach jest zawsze mniej niż wewnątrzkomórkowych (jak np. COX-2), a ich poziom i lokalizacja są ściśle regulowane. Tutaj na dodatek nie opisano sposobu przygotowania lizatu komórkowego do testu ELISA, nie wiadomo, czy zawierał komponenty błonowe, czy nie.

Kolejnym problemem w przypadku danych z testów ELISA jest brak normalizacji wyniku na liczbę komórek w próbce lub stężenie białka w próbce: z wyników cytotoxycywności preparatów pektyn pokazanych na rys. 1 (*Cancers*, 2021; *Pharmaceuticals*, 2022) widać znaczny, około 50-60% spadek liczby żywych komórek przy stężeniu pektyn 0,2 mg/ml (co jest zresztą przeanalizowane później pod kątem wysokiego odsetka komórek apoptotycznych oraz wzrostu liczby komórek nekrotycznych). Takiej samej sytuacji możemy spodziewać się w doświadczeniu z LPS. Z opisu osi na wykresach oraz metodyki wynika, że poziom badanych białek wyrażony jest w jednostkach stężenia (pg/ml lub ng/ml) w lizacie, nie zaś w przeliczeniu na pojedynczą komórkę albo na µg białka w próbce (takiej informacji nie ma też w metodyce), czyli spadek poziomu badanych białek po inkubacji z pektynami lub LPS i pektynami może wynikać wyłącznie z tego, że w próbce było znacznie mniej żywych komórek. Podobny zarzut dotyczący normalizacji można wysunąć do wyników dotyczących poziomu galektyny-3 w lizatach (*Pharmaceuticals*, 2022, rys. 9).

Bardzo dziwi również stwierdzenie Autorów zamieszczone w dyskusji (*Pharmaceuticals*, 2022, str. 12, wiersze 47-48,), że zdolność pektyn do wiązania się do TLR-4 mierzono testem ELISA. To nie było możliwe, bo w teście ELISA wykrywano wiązanie białka TLR-4 obecnego w lizacie z przeciwciałem, natomiast wielkocząsteczkowe pektyny (419 i 899 kDa) pozostały w płynie pohodowlanym (nie mogą one wnikać do komórek, nie było ich zatem w lizacie). Dyskusyjny jest również wybór TLR-4 jako białka-kandydata do wytłumaczenia działania

przeciwzapalnego pektyn, ponieważ wszystkie trzy badane linie komórkowe reagowały na pektyny i LPS w prawie identyczny sposób (Pharmaceuticals 2022, rys. 8, S6), ale tylko jedna z tych linii (HT-29) produkuje wykrywalne ilości TLR-4. Dalej w dyskusji Autorzy rzeczywiście piszą, że za działanie LPS odpowiada prawdopodobnie inny receptor, na przykład TLR-2. Skoro tak, to szkoda, że w pracy nie zaplanowano zbadania tego wątku, zamiast TLR-4. Rola TLR-2 jest prawdopodobna, ponieważ wszystkie trzy linie HCT 116, Caco-2 i HT-29 wykazują ekspresję TLR-2 [9,10], ale w takim razie lepiej byłoby użyć do wywołania stanu zapalnego selektywny ligand dla TLR-2, np. lipopeptyd Pam3CSK4.

3.2.3. *Badanie poziomu galektyny-3.* Galektyna-3 jest białkiem, które jest w komórkach obecne w wielu przedziałach: na powierzchni błony komórkowej, w cytoplazmie, w jądrze komórkowym i w mitochondriach, a także może być wydzielana poza komórkę i łączyć się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. Autorów interesował poziom wewnątrzkomórkowej galektyny-3 (czyli prawdopodobnie sumaryczna ilość ze wszystkich przedziałów: cytoplazmy, jądra komórkowego, mitochondriów), stąd wykonanie oznaczenia ELISA na lizatach komórkowych. Nie przedstawiono metody przygotowania lizatów, składu buforu lizującego ani kontroli w postaci detekcji białek markerowych, więc nie wiemy, czy liza była wydajna. Pytanie to wydaje się zasadne w kontekście danych literaturowych, które wskazują, że linie raków jelita grubego różnią się ekspresją galektyny-3: HCT 116 i HT-29 mają bardzo niski poziom białka galektyny-3, natomiast Caco-2 wysoki [4], z wyniki podane w publikacji w *Pharmaceuticals* (2022) na rys. 9 oraz aneksie do pracy z danymi uzupełniającymi sugerują, że poziom galektyny-3 we wszystkich liniach jest bardzo podobny i dość duży, rzędu 30-40 ng/ml (rys. S7). Poza tym nie jest jasne, dlaczego wyniki tego testu ELISA Autorzy interpretują jako dowód na bezpośrednią interakcję pomiędzy pektynami, a galektyną-3 (*Pharmaceuticals*, 2022, str. 13, wiersz 27). Pektyn nie było przecież w lizacie komórkowym, ponieważ pozostały w płynie pochodowym, zanim sporządzono lizaty do testu ELISA.

3.2.4. *Poziom reaktywnych form tlenu w komórkach oraz peroksydacja lipidów.* Jak stwierdzono, preparaty pektyn PX i PCX wywołały znaczny wzrost produktów peroksydacji lipidów (aldehydu dimalonowego, MDA) oraz wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (RFT), zwłaszcza w przypadku komórek inkubowanych z pektynami w obecności SN-38. Autorzy nie pokusili się o wyjaśnienie, jaki mógł być mechanizm takiego działania pektyn i jakie ewentualnie szlaki przekazywania sygnału w komórce były za to odpowiedzialne. Jak wspomniano powyżej, pektyny ze względu na swoją masę cząsteczkową nie wnikają do komórek ani nie są przez nie pobierane, więc w wywoływaniu stresu oksydacyjnego wewnątrz muszą pośredniczyć jakieś

dotatkowe czynniki. Szkoda też, że nie wykonano doświadczenia z oznaczaniem MDA i RFT w hodowli ludzkich prawidłowych komórek FHC (stosowanych przez Autorów w doświadczeniach z oznaczaniem cytotoksyczności) w obecności pektyn. Wynik takiego doświadczenia pomógłby stwierdzić, czy pektyny wywołują stres oksydacyjny selektywnie w komórkach nowotworowych (na przykład z powodu niewydajnego aparatu enzymatycznego chroniącego przed stresem oksydacyjnym), czy też jest to działanie uniwersalne, obserwowane w hodowlach komórek bez względu na transformację nowotworową.

3.2.5. *Hamowanie działania bakteryjnej  $\beta$ -glukuronidazy.* Bardzo ciekawe i ważne jest stwierdzenie inhibicji  $\beta$ -glukuronidazy w lizatach z bakterii *E. coli* szczepów LF82 i K12 przez preparat pektyn PC (*Cancers*, 2021, Rys. 9). Działanie hamujące w przypadku PC jest znacznie silniejsze niż w przypadku dostępnego komercyjnie preparatu PectaSol-C. Autorzy wyciągają wniosek, że preparat PC mógłby łagodzić biegunkę wywołaną przez SN-38 hamując rozkładanie SN-38G. Powstaje jednak pytanie, czy ten wniosek nie jest zbyt daleko idący, ponieważ mikrobiota jelitowa produkująca  $\beta$ -glukuronidazy jest bardzo zróżnicowana, a enzymy te mają różną budowę centrum aktywnego: niektóre są dostosowane do hydrolizy wiązań  $\beta$ -glikozydowych w obrębie dużych substratów jak polisacharydy, a inne umożliwiają hydrolizę tylko drobnocząsteczkowych glikozydów [2]. Oprócz tego, u części bakterii, w tym *E. coli*,  $\beta$ -glukuronidaza posiada lokalizację wewnątrzkomórkową oraz częściowo jest wydzielana do przestrzeni periplazmatycznej [2]. W opisanym w pracy doświadczeniu inhibicję wykazano podczas inkubacji pektyn z lizatem bakteryjnym, a więc lokalizacja enzymu nie była istotna. W warunkach *in vivo* wielocząsteczkowa pektyna nie będzie miała dostępu do enzymu zlokalizowanego w przestrzeni periplazmatycznej, podczas gdy SN-38G mający małą masę cząsteczkową ma szansę tam się dostać i ulec hydrolizie, nie zawsze więc można się spodziewać, że pektyny skutecznie zahamują konwersję wsteczną SN-38G do SN-38.

W związku z powyższymi uwagami proszę, aby Doktorant odniósł się do nich w czasie obrony, zwracając szczególnie uwagę na:

1. Wytlumaczenie racji stojących za użyciem opisanego modelu doświadczalnego stanu zapalnego, w tym schematu stymulacji LPS
2. Wyjaśnienie sposobu przygotowania próbek do ilościowego oznaczania poziomu COX-2, IL-6, TLR-4 i Gal-3 oraz możliwego wpływu tego sposobu na uzyskane wyniki.

Proszę też o odpowiedzi na następujące pytania:

1. Czy obniżenie liczby żywych komórek linii FHC w hodowli w obecności pektyn PX i PCX wynikało z zahamowania proliferacji czy też z cytotoksyczności (zwiększonej liczby martwych komórek)?

2. Czy można zauważyć korelację pomiędzy wrażliwością na cytotoksyczne działanie pektyn, a tempem proliferacji w badanych liniach nowotworowych?
3. Jaki mechanizm może być odpowiedzialny za wywoływanie stresu oksydacyjnego przez pektyny? Czy pro-oksydacyjne działanie pektyn ma związek z ich budową, w tym zawartością frakcji HG, RGI, RGII (PC wydają się mieć silniejsze działanie niż PX i PCX)?
4. Czy synergistyczne działanie preparatów pektyn jabłkowych PC, PX i PCX z aktywną formą irynotekanu można skorelować z budową tych pektyn oraz ewentualnym ich działaniem na receptory TLR?
5. Jaki może być mechanizm hamowania aktywności bakteryjnej  $\beta$ -glukuronidazy przez pektyny: czy inhibicja kompetycyjna, czy jakiś inny mechanizm, tłumaczący różnice w działaniu pektyny PC oraz PectaSol-C mógłby być zaproponowany?

#### 4. Podsumowanie

Mimo przedstawionych powyżej uwag krytycznych uważam, że zawarte w publikacjach doświadczalnych wyniki, zwłaszcza te dotyczące działania synergistycznego pomiędzy preparatami enzymatycznie izolowanych pektyn, a aktywnym metabolitem irynotekanu istotnie poszerzają obecny stan wiedzy na temat biologicznego działania pektyn. Uzyskane wyniki mają duże znaczenie aplikacyjne i mogą być w przyszłości wykorzystane do planowania badań klinicznych dotyczących nowych, skojarzonych formuł podawania irynotekanu. Dużym atutem pracy jest zademonstrowanie biologicznej aktywności dobrze scharakteryzowanych i różniących się pomiędzy sobą preparatów pektyn. Cytotoksyczne i proapoptotyczne działanie różnych preparatów pektyn zostało gruntownie przebadane na kilku liniach komórkowych raka jelita grubego, co daje podstawy sądzić, że może to być zjawisko uniwersalne. Interesujące i wartościowe są również wyniki demonstrujące pro-oksydacyjne działanie pektyn oraz inhibicję bakteryjnej  $\beta$ -glukuronidazy, te wątki badawcze zasługują z pewnością na rozwinięcie w przyszłości.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana lek. med. Jerzego Maksymowicza spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.), w związku z czym wnioskuję o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Maja Gwóźdź*

*Kraków, dn. 15.01.2023*

Spis cytowanych w recenzji prac:

1. Arthur, J.C. Microbiota and colorectal cancer: colibactin makes its mark. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2020**, *17*, 317-318, doi:10.1038/s41575-020-0303-y.
2. Pollet, R.M.; D'Agostino, E.H.; Walton, W.G.; Xu, Y.; Little, M.S.; Biernat, K.A.; Pellock, S.J.; Patterson, L.M.; Creekmore, B.C.; Isenberg, H.N.; et al. An Atlas of beta-Glucuronidases in the Human Intestinal Microbiome. *Structure* **2017**, *25*, 967-977 e965, doi:10.1016/j.str.2017.05.003.
3. Zhou, J.Y.; Chen, M.; Ma, L.; Wang, X.; Chen, Y.G.; Liu, S.L. Role of CD44(high)/CD133(high) HCT-116 cells in the tumorigenesis of colon cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 7657-7666, doi:10.18632/oncotarget.7084.
4. Shi, Y.; He, B.; Kuchenbecker, K.M.; You, L.; Xu, Z.; Mikami, I.; Yagui-Beltran, A.; Clement, G.; Lin, Y.C.; Okamoto, J.; et al. Inhibition of Wnt-2 and galectin-3 synergistically destabilizes beta-catenin and induces apoptosis in human colorectal cancer cells. *Int J Cancer* **2007**, *121*, 1175-1181, doi:10.1002/ijc.22848.
5. Suzuki, M.; Hisamatsu, T.; Podolsky, D.K. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect Immun* **2003**, *71*, 3503-3511, doi:10.1128/IAI.71.6.3503-3511.2003.
6. Park, J.H.; Lee, J.M.; Lee, E.J.; Kim, D.J.; Hwang, W.B. Kynurenine promotes the goblet cell differentiation of HT-29 colon carcinoma cells by modulating Wnt, Notch and AhR signals. *Oncol Rep* **2018**, *39*, 1930-1938, doi:10.3892/or.2018.6266.
7. Fukata, M.; Chen, A.; Vamadevan, A.S.; Cohen, J.; Breglio, K.; Krishnareddy, S.; Hsu, D.; Xu, R.; Harpaz, N.; Dannenberg, A.J.; et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology* **2007**, *133*, 1869-1881, doi:10.1053/j.gastro.2007.09.008.
8. Wikiera, A.; Mika, M.; Starzynska-Janiszewska, A.; Stodolak, B. Endo-xylanase and endo-cellulase-assisted extraction of pectin from apple pomace. *Carbohydr Polym* **2016**, *142*, 199-205, doi:10.1016/j.carbpol.2016.01.063.
9. Meng, S.; Li, Y.; Zang, X.; Jiang, Z.; Ning, H.; Li, J. Effect of TLR2 on the proliferation of inflammation-related colorectal cancer and sporadic colorectal cancer. *Cancer Cell Int* **2020**, *20*, 95, doi:10.1186/s12935-020-01184-0.
10. Furrle, E.; Macfarlane, S.; Thomson, G.; Macfarlane, G.T.; Microbiology, Gut Biology, G.; Tayside, T.; Tumour, B. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology* **2005**, *115*, 565-574, doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02200.x.