



Wrocław, 02.12.2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana lek. Jerzego Maksymowicza pod tytułem
"Ocena interakcji genotoksycznych szczepów E.coli z nabłonkiem jelita grubego
i wpływu pektyn na aktywność przeciwnowotworową irynotekanu"
zrealizowanej w Katedrze i Zakładzie Biofizyki i Neurobiologii Uniwersytetu
Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod kierunkiem Pani Promotor
dr hab. n. med. Kamili Środy-Pomianek**

Wiele dotychczas zgromadzonych danych wskazuje, że pektyny mogą zwiększać efektywność leczenia raka jelita grubego (CRC), który jest jednym z najczęściej występujących nowotworów na świecie. Pektyny jako składnik diety działają na organizm w sposób plejotropowy, jednak w ostatnim czasie wykazano m.in. synergizm działania tego typu substancji z chemioterapeutykami oraz proapoptotyczne działanie na komórki nowotworowe w warunkach *in vitro*. Wykazano także hamujący wpływ pektyn na aktywność induktorów stanu zapalnego oraz tworzenie przez nie bariery chroniącej nabłonek przed oportunistyczną mikroflorą jelitową. Z drugiej jednak strony, nasza wiedza na temat potencjalnej efektywności pektyn w terapiach przeciwnowotworowych wciąż pozostaje w dużym stopniu niekompletna. By zmienić taki stan rzeczy konieczne jest rozszerzenie dotychczas przeprowadzonych badań o nowe preparaty pektynowe i przeprowadzenie większej ilości eksploracji na poziomie komórkowym ze szczególnym naciskiem na poznanie molekularnych mechanizmów działania pektyn, szczególnie w połączeniu z chemioterapeutykami.

Przedstawiona do oceny dysertacja naukowa wychodzi naprzeciw tym potrzebom. Jej Autor postanowił przetestować wpływ pektyny, które w sposób nowatorski były wyekstrahowane z wyłoków jabłkowych przy użyciu m.in. endocelulazy lub endoksyłanazy, na komórki kilku linii wyprowadzonych z ludzkiego raka jelita grubego. Chociaż podobne podejście było już opisywane w literaturze, dotychczas zgromadzone dane nie pozwoliły na uzyskanie całościowego i jednoznacznego opisu wspomnianych zagadnień. Badania Doktoranta, dzięki wielopoziomowemu podejściu metodologicznemu i docieklivej interpretacji uzyskanych danych, pozwalają w znacznym stopniu przybliżyć się do tego celu.



Autor pracy doktorskiej przedstawił swoje dokonania w postaci zestawu trzech, powiązanych ze sobą tematycznie artykułów. Dwa z nich to wieloautorskie prace eksperymentalne opublikowane w czasopismach o międzynarodowym zasięgu (sumaryczny współczynnik oddziaływania *Impact Factor* przekracza 11): *Cancers* oraz *Pharmaceuticals*. Trzecia praca to krótka monografia w języku polskim przedstawiająca zarys problematyki częściowo pokrywającej się z meritem pozostałych artykułów. Doktorant jest jeszcze współautorem innej publikacji w czasopiśmie o IF przekraczającym 3. Pomimo stosunkowo krótkiego czasu od opublikowania, prace eksperymentalne zostały już zauważone w środowisku naukowym, o czym świadczy sumaryczna ilość cytowań wynosząca 24 (wg bazy Scopus na dzień sporządzenia recenzji). We wszystkich artykułach składających się na rozprawę doktorską lek. Jerzy Maksymowicz jest pierwszym autorem/współautorem. Dołączone oświadczenia współautorów oraz informacje zawarte w publikacjach (tzw. „author contribution”) wyraźnie wskazują na znaczącą rolę Doktoranta w powstaniu tych publikacji, polegającą na przeprowadzeniu eksperymentów i analizie wyników oraz udziale w planowaniu eksperymentów.

Na rozprawę doktorską, oprócz wspomnianych powyżej publikacji składają się dodatkowe elementy przygotowane w języku polskim, takie jak streszczenie (także w wersji anglojęzycznej), wstęp, cele projektu, materiały i metody oraz podsumowanie i wnioski. Wspomniane elementy pracy mają na celu przede wszystkim wprowadzenie czytelnika w meritem publikacji stanowiących rdzeń dysertacji. Zaskakuje nieco raczej wąski zasób informacji zawartych we wstępie, który opatrzony jest odnośnikami do 29 pozycji literaturowych. Jest to kompilacja niemal dosłownych tłumaczeń fragmentów publikacji stanowiących trzon pracy doktorskiej, co niestety z jednej strony przyczynia się do zubożenia przekazu (dublowanie informacji przedstawionych w innej części dysertacji i brak uwzględnienia najnowszych doniesień literaturowych, w tym cytujących prace Doktoranta), a z drugiej wzbudza pewne wątpliwości w świetle faktu, iż deklarowany w publikacji II udział Doktoranta nie obejmuje przygotowywania i edycji oryginalnego tekstu. Nasuwa się pytanie kto jest rzeczywistym autorem większości tekstu w tej części pracy. W moim odczuciu rozdział ten mógłby być zdecydowanie bardziej rozbudowany poprzez szerszy opis zagadnień ważnych dla pełniejszego zrozumienia dalszych części dysertacji (na przykład bardziej szczegółowe przedstawienie różnic strukturalnych pektyn otrzymanych z różnych źródeł i różnymi metodami, różnorodność funkcjonalną pektyn w odniesieniu do chorób przewodu pokarmowego, omówienie modeli stosowanych w



badaniach nad nowotworami jelita grubego (w tym linii komórkowych stosowanych w trakcie realizacji projektu doktorskiego), itp.). Bardzo dobrym posunięciem jest zebranie szczegółowych celów projektu badawczego w postaci zwartej listy następującej bezpośrednio po wstępie. Jedynie pierwszy punkt tej listy jest nieco mniej oczywisty, gdyż przegląd doniesień literaturowych nie powinien być celem samym w sobie, a raczej środkiem do właściwego osadzenia projektu w przestrzeni danej dziedziny naukowej. Dalszą część pracy stanowi opis materiałów i metod. Nie do końca wiadomo jaką rolę ma spełniać ten fragment, gdyż nie stanowi on rozszerzenia opisów zawartych w stanowiących podstawę rozprawy publikacjach, a raczej jest ich wersją skróconą według nie do końca jasnych kryteriów. Szkoda, że autor nie wykorzystał tego rozdziału do uzupełnienia opisu materiałów i metod (na przykład o źródło/pochodzenie szczepów bakteryjnych K-12, pełny opis procesu otrzymywania pektyn itp.) w takim zakresie, na który zwykle nie pozwala restrykcyjne podejście redakcji czasopism do objętości składanych do nich manuskryptów. Natomiast bardzo dobrym posunięciem jest zwieńczenie całości rozdziałem zatytułowanym „Podsumowanie i wnioski”, w którym Autor w sposób zwartej przedstawia swoje najważniejsze obserwacje, unikając jednak przy tym bardziej wnikliwej dyskusji i interpretacji. Ostatnie z wymienionych elementów są jednak odpowiednio rozbudowane w oryginalnych publikacjach.

Badania, które przeprowadził lek. Jerzy Maksymowicz w ramach realizacji projektu doktorskiego mają nie tylko dużą wartość poznawczą, ale są także bardzo dobrym przykładem właściwego wykorzystania różnych podejść metodologicznych w procesie eksplorowania właściwie zidentyfikowanych obszarów badawczych. Wspólnym mianownikiem obu prac eksperymentalnych jest ocena wpływu pektyn jabłkowych otrzymywanych w różny sposób na komórki reprezentujące nowotwory jelita grubego w warunkach *in vitro*. W tym kontekście nieco mylący jest tytuł rozprawy, który sugeruje raczej badania nabłonka jelita, a nie badania z wykorzystaniem komórek w hodowlach. W toku badań udało się stwierdzić, że badane pektyny negatywnie wpływały na żywotność komórek raka jelita grubego, indukowały apoptozę i zwiększały wewnątrzkomórkowy poziom reaktywnych form tlenu. Pektyny te mają także potencjał adjuwantów terapii irynotekaniem i mogą dodatkowo złagodzić efekty uboczne tej terapii poprzez hamowanie bakteryjnego enzymu beta-glukuronidazy oraz adhezji inwazyjnych szczepów *E.coli* do powierzchni komórek. Jak postuluje Doktorant, molekularny mechanizm działania przeciwnowotworowego i przeciwnowotworowego badanych pektyn może się częściowo opierać o galektynę-3 oraz receptory TLR4. Jednocześnie wskazuje on, że lepsze właściwości



przeciwnowotworowe pektyny PCX (frakcji izolowanej przy użyciu endocelulazy i endoksyłanazy) mogą wynikać z jej stosunkowo niskiej masy cząsteczkowej oraz wysokiego udziału regionów RG I (ramnogalakturonianu I)

Obie wspomniane powyżej publikacje oparte są o bardzo podobne podejścia eksperymentalne, przy czym dobór metod i sposób realizacji badań nie budzi większych zastrzeżeń. Generalnie, konkluzje znajdują swoje odzwierciedlenie w przedstawionych danych, a wyniki mają nie tylko wartość poznawczą, ale także potencjał aplikacyjny. Niemniej, pojawia się kilka opisanych poniżej kwestii, które wymagałyby bardziej dogłębnej dyskusji.

1. Przede wszystkim fakt, iż badania prowadzono przy użyciu ograniczonego repertuaru linii komórkowych, a w szczególności przy bardzo niewielkim udziale linii nienowotworowych (jedna linia użyta w niektórych eksperymentach) rodzi pytanie o specyficzność indukcji obserwowanych efektów cytotoksycznych i proapoptotycznych względem komórek nowotworowych. Jeśli są przesłanki do przypuszczenia, że badane pektyny nie działają w ten sam sposób na komórki zdrowe to jakie mechanizmy molekularne mogłyby się kryć za tą specyficznością? Autor rozprawy wskazuje, że m.in. obserwowane przez niego efekty synergistyczne są zależne od rodzaju komórek nowotworowych.
2. Jakie jest prawdopodobieństwo, że obserwowane efekty pektyno-zależnej inhibicji odpowiedzi prozapalnej komórek po ich stymulacji za pomocą LPSu pozostają w związku przyczynowo-skutkowym z indukcją apoptozy i cytotoksycznością pektyn? Zarówno efekty cytotoksyczne/apoptotyczne jak i poziom interleukiny i cyklooksyzogenazy były badane 48 godz. po dodaniu do medium pektyn. Tego typu potencjalne sprzężenie wydaje się bardziej oczywiste jeśli spojrzeć na inne wyniki (na przykład te wskazujące na indukowany pektynami spadek ekspresji galektyny-3).
3. Bardzo intrygująco wygląda indukowany pektynami wzrost peroksydacji lipidów oraz poziomu reaktywnych form tlenu w konfrontacji ze stwierdzeniem Autora rozprawy, że obserwacja ta pozostaje w oczywistej sprzeczności z licznymi doniesieniami na temat aktywności antyoksydacyjnej różnych preparatów pektynowych.
4. Jakiego efektu pektyn na komórki nabłonka jelita grubego można byłoby się spodziewać w warunkach in vivo, biorąc także pod uwagę stężenia i czasy inkubacji odpowiadające tym prezentowanym w rozprawie?

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**ZAKŁAD CYTOBIOCHEMII
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 64 18

www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-cytobiochemii

Przedyskutowanie przedstawionych powyżej kwestii byłoby cennym dopełnieniem i dodatkowym potwierdzeniem tego, że cykl publikacji stanowiący podstawę recenzowanej pracy doktorskiej stanowi nietuzinkowy wkład w rozwój reprezentowanej przez Autora dziedziny naukowej.

W ujęciu formalnym praca wywiera pozytywne wrażenie. Błędy typograficzne, gramatyczne i kolokwializmy występują zarówno w oryginalnych publikacjach jak i w tekście towarzyszącym tym publikacjom (kilka bardziej istotnych przykładów to: błędne stężenie LPS podane w Figure 6 publikacji II, niewłaściwa pisownia nazwy enzymu ksylanazy, użycie słowa „solo”). Występują także niedociągnięcia edytorskie (np. brak strony 3 publikacji I), a układ poszczególnych części pracy nie zawsze jest przemyślany (np. brak włączenia tzw. „supplementary materials” publikacji eksperymentalnych, odwrócona kolejność podsumowania poszczególnych publikacji w ostatnim rozdziale itp.). Pragnę jednak podkreślić, że wyszczególnione drobne niedociągnięcia nie mają istotnego wpływu na pozytywną recepcję całej rozprawy, która z pewnością stanowi wartościowe osiągnięcie naukowe.

W moim przekonaniu przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana lek. Jerzego Maksymowicza spełnia wszystkie 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.), a dorobek naukowy Doktoranta w pełni uzasadnia nadanie mu stopnia naukowego doktora w dyscyplinie naukowej nauki medycznej. Niniejszym wnoszę o dopuszczenie lek. Jerzego Maksymowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Aleksander Czogalla

