

*Prof. dr hab. Ryszard Oliński  
Katedra Biochemii Klinicznej  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Collegium Medium im. L.Rydygiera w Bydgoszczy*

Ocena rozprawy na stopień doktora nauk mgr inż. Sylwii Ciesielskiej *MECHANIZMY*

*REGULACJI STANU REDOKS W ŻYWYCH KOMÓRKACH*

Reaktywne formy tlenu (RFT), obok typowych czynników redukcyjnych, regulują wiele funkcji komórkowych biorąc m.in. udział w modelowaniu komunikacji komórkowej i katalizowaniu różnorodnych reakcji biochemicznych.

RFT towarzyszą fundamentalnym reakcjom niezbędnym dla życia komórki aerobowej, muszą więc być obecne w każdej komórce, w każdym organizmie uzależnionym od tlenu, mimo negatywnego wpływu na struktury komórkowe. Przypuszcza się, że RFT odpowiadają za etiologie wielu jednostek chorobowych, od prostych stanów zapalnych zaczynając na AIDS i nowotworach kończąc ( B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge „Free Rad. Biol.Med.„ 1989, Bartosz, „Druga twarz tlenu). Zarówno promieniowanie jonizujące, jak i nadtlenek wodoru mogą być źródłem najbardziej reaktywnej formy tlenu jaką jest rodnik OH.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> może swobodnie penetrować przez błony komórkowe i odpowiadać za powstanie rodnika OH (przy udziale Fe). Reakcje rodnika OH z biomolekułami (w tym z DNA) mogą odpowiadać za powstanie mutacji i transformacji nowotworowej komórki (B.C.Ames Mut.Res.,250,1991,3 B. Halliwell, Free Rad Biol. Med.,1989). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> występuje w podwyższonym stężeniu w komórkach nowotworowych (T.H.Szatrowski,Cancer Res. 51,1991,794). Promieniowanie jonizujące jest czynnikiem mutagennym i karcynogennym. Organizm dysponuje całym szeregiem mechanizmów zabezpieczających przed szkodliwym działaniem RFT.

Powszechnie przyjmuje się, że efektywnym czynnikiem neutralizującym RFT są enzymy o znaczeniu antyoksydacyjnym. W powyżej opisaną tematykę dobrze wpisuje się recenzowana praca doktorska.

Temat rozprawy mgr inż. Sylwii Ciesielskiej jest więc w pełni uzasadniony, aktualny i celowy. Powyższe informacje wskazują, że Autorka podjęła się rozwiązania ważnego problemu.

Praca ma układ przejrzysty, a wyniki ujęte są w czytelnie przedstawionych tabelach i na rysunkach. Praca ma typowy układ charakterystyczny dla prezentacji badań eksperymentalnych. Brak jest jednak rozdziału *Wnioski*, który z reguły podsumowuje prezentację wyników.

Rozprawa obejmuje 73 strony tekstu z rysunkami i tabelami oraz ponad 200 pozycji piśmiennictwa, z których zdecydowana większość to prace z ostatnich kilku lat. Cytowane pozycje literaturowe stanowią obszerną bibliografię prac poświęconą w większości charakterystyce działania promieniowania UV i jonizującego oraz nadtlenu wodoru na komórki nowotworowe, a także wiadomościom o czynnikach komórkowych warunkujących wrażliwość na te czynniki. Tym zagadnieniom poświęcona jest również część teoretyczna. Mimo bardzo zwartej formy, „Wstęp” stanowi dobre wprowadzenie w zagadnienia będące przedmiotem pracy.

Celem pracy mgr inż. Sylwii Ciesielskiej było *wyjaśnienie/sprawdzenie czy mechanizmy regulujące komórkowy stan oksydoredukcyjny działają podobnie w różnych typach komórek*. Ogólny cel pracy (patrz wyżej) został uzupełniony o następane zadania badawcze, których podstawowym założeniem była odpowiedź na pytania: i/ *czy w różnych typach komórek enzymy zaangażowane w w/w procesy są regulowane na poziomie transkrypcji*; ii/ *czy można wykazać znamienne różnice międzykomórkowe ekspresji genów zaangażowanych w produkcję i neutralizację reaktywnych form tlenu i azotu*; iii/ *czy poziomy enzymów zaangażowanych w regulację procesów oksydoredukcyjnych mogą być regulowane w procesie translacji na drodze oddziaływań z miRNA*.

Cel rozprawy został dobrze określony przez Autorkę, a jego osiągnięcie udowodnione zostało w zebranych wynikach ocenianej pracy i publikacjach Doktorantki.

Streszczenie pracy jest podsumowaniem zarówno części teoretycznej, nawiązującej do tematu dysertacji, jak i krótkim omówieniem wyników, a zakończone jest przedstawieniem wniosków. Streszczenie jest więc, w odczuciu recenzującego, typową rozprawą doktorską podaną w pigułce.

Doktorantka zastosowała trafnie techniki i testy używane w dobrych laboratoriach genetyki molekularnej. Zwraca uwagę logiczny i konsekwentny zestaw metod:

- Test klonogeny pozwalający na ocenę przeżywalności i proliferacji komórek;
- Analiza reaktywnych form tlenu i azotu w badanych komórkach, wykorzystująca właściwości fluorescencyjne;

- Analiza mikromacierzy mRNA korzystając z danych z eksperymentów mikromacierzowych dostępnych w bazie danych ArrayExpress;
- Analiza miRNA odpowiedzialnych za hamowanie ekspresji genów związanych ze stanem redoks;
- Opracowanie i zastosowanie do analiz modelu matematycznego dla którego dane zostały zaimplementowane w środowisku Matlab Simulink, w którym zostały wykonane wszystkie symulacje przedstawione w pracy;

Zastosowana metodyka pozwoliła na osiągnięcie postawionych w dysertacji celów badawczych.

Wstęp (część teoretyczna) jest obszerną próbą omówienia danych literaturowych dotyczących stresu oksydacyjnego i jego wpływu na stan redoks komórki. W większości taka tematyka doczekała się już detalicznego omówienia w ogólnie dostępnych podręcznikach (np. G. Bartosz, *Druga twarz tlenu*, PWN 2003). Odnoszę wrażenie, że Autorka postawiła sobie zadanie opracowania/zacytowania każdej przeczytanej pracy związanej ze stresem oksydacyjnym/stanem redoks, bez podjęcia wysiłku krytycznego spojrzenia na wartość/znaczenie cytowanych wyników.

Dyskusja zdaniem recenzenta jest, podobnie jak Wstęp „lekką przegadana”. W moim przekonaniu objętościowa redukcja obu rozdziałów i ograniczenia tekstu do zagadnień związanych bezpośrednio z tematem pracy uczyniłyby rozprawę bardziej klarowną i bardziej zrozumiałą.

Z drugiej strony można założyć, że młody pracownik naukowy, na początku swojej kariery, jest zafascynowany tematem badań i czyta wszystko, co w bardzo szerokich ramach dotyczy uprawianej tematyki. Dobrze jednak zacząć wyrabiać w sobie zmysł krytycyzmu i zacząć różnicować to co istotne od tego co z prawdziwą nauką ma niewiele wspólnego. Może na początku dobrze jest opierać się na pracach opublikowanych w renomowanych czasopiśmie z Lisy Filadelfijskiej?

Doktorantka nie uniknęła nieporządku i błędnych sformułowań. Np. w rozdziale *Rodzaje reaktywnych form tlenu* opisuje także reaktywne formy azotu. Na stronie 10 Autorka pisze *Reakcje redoks to wszystkie reakcje utleniania i redukcji, w których następuje przepływ elektronu związany z pojawianiem się i neutralizacją reaktywnych form tlenu (RFT, ang. reactive oxygen species, ROS) i azotu (RFA, ang. reactive nitrogen species, RNS) zwanych inaczej wolnymi rodnikami*. Wszystkie wolne rodniki są również RFT, ale nie wszystkie RFT są wolnymi rodnikami. Wolne rodniki to szczególna forma RFT i nie należy tego mylić! Ten błąd można spotkać również w innych częściach pracy.

I dalej na tej samej stronie; *Wysoce prawdopodobne jest to, że komórki **nie potrafią odróżnić** reaktywnych form tlenu produkowanych po ekspozycji na promieniowanie od tych, które powstają podczas prawidłowego procesu oddychania komórkowego.* Na stronie 22; *jednak komórki **nie są w stanie rozróżnić**, które RFT zostały wyprodukowane przez samą komórkę, np. podczas oddychania komórkowego, a które po ekspozycji na niskie dawki promieniowania.* Na stronie 60; ***Komórki nie są w stanie rozróżnić** źródła RFT, **nie wiedzą**, które RFT pochodzą z mitochondriów, a które są indukowane przez czynniki zewnętrzne. Komórki **nie są w stanie** rozróżnić źródła RFT, **nie wiedzą**, które RFT pochodzą z mitochondriów, a które są indukowane przez czynniki zewnętrzne.* Przypisywanie komórkom świadomości, bo tylko wtedy komórki „potrafiłyby odróżniać...” jest zbyt śmiałym i nieprawdziwym założeniem.

Autorka analizowała **tylko** tkanki/komórki nowotworowe. Nie można więc stwierdzić, że obserwowane zjawiska są charakterystyczne dla tego typu komórek. Można byłoby analizy wykonać dla niektórych linii komórek normalnych/zdrowych i pokusić się o odpowiednie wnioski.

Jedną z metod/sposobów analizy używaną przez Doktorantkę są *Nieintuicyjne mechanizmy regulacji*. Encyklopedyczna definicja intuicji to „narzucające się przekonanie, którego nie można w pełni uzasadnić”. Jak w tym kontekście określić pojęcie nieintuicyjne mechanizmy? Przydałaby się definicja.

Poczynione powyżej uwagi mają w większości charakter redakcyjny, bądź dyskusyjny i nie mają wpływu na pozytywną ocenę pracy. Doktorantka wykazała dużą wiedzę z zakresu biomedycyny, o czym świadczy zarówno Wstęp jak i Dyskusja. Przedłożona mi praca zawiera elementy nowości naukowej, o których wspominałem powyżej, dowodzi osiągnięcia zamierzonego celu.

Mimo, że temat recenzowanej monografii jest intensywnie eksploatowany, w literaturze można znaleźć bardzo dużo prac poświęconych znaczeniu stanu redoks dla komórki (baza *PubMed*), Autorka dostrzegła lukę w dostępnej nam wiedzy i starała się ją uzupełnić wynikami opisanymi w rozprawie.

Nie będę w recenzji koncentrował się na szczegółowym omawianiu wyników doktoratu. Czytelnik, który chciałby chociażby pobieżnie zaznajomić się z rezultatami znajdzie je zarówno w streszczeniu zamieszczonym na początku pracy jak i w rozdziale *Wyniki*.

Przechodząc do merytorycznej oceny pracy chciałbym podkreślić, że wszystkie opisane w syntetycznej formie, w rozdziale *Wyniki* rezultaty badań są w pełni oryginalnymi osiągnięciami naukowymi.

Sądzę, że oryginalność wyników recenzowanej pracy jest dobrze zilustrowana na schemacie zamieszczonym na Rysunkach 16/17, które to ryciny są jednocześnie eleganckim podsumowaniem wyników. Spośród wielu znaczących szczegółowych rezultatów składających się na rozprawę doktorską mg inż. Sylwii Ciesielskiej należy przede wszystkim wymienić;

- Rezultaty wskazujące na stymulację proliferacji komórek HCT116 i Me45 po ekspozycji na promieniowanie UVA w dawkach zbliżonych do środowiskowych. W rozprawie pokazano, że takie dawki zwiększają potencjał klonogeny komórek HCT116 i Me45, w zakresie specyficznym dla dawki i typu komórki (Rysunek 4). Wzrost frakcji komórek przeżywających obserwowany, jak sugeruje Autorka, odzwierciedla indukcję proliferacji komórek niż spadek apoptozy, ponieważ podstawowa frakcja apoptotyczna w badanych komórkach była bardzo mała;
- Wyniki wskazujące, że w zależności od poziomów wyjściowych enzymów neutralizujących komórki inaczej neutralizują  $H_2O_2$ . Z przeprowadzonych przez Doktorantkę eksperymentów wynika, że poziom  $H_2O_2$  w komórkach Me45 jest wyższy niż w komórkach HCT116 (Rysunek 15), co może potwierdzać mniej wydajną neutralizację  $H_2O_2$  w komórkach Me45, a co za tym idzie śmierć przy niższej dawce promieniowania, co z kolei może przekładać się na ich przeżycie przy wyższych stężeniach RFT;
- Symulacje bazujące na modelu matematycznym pokazującą, że w przypadku komórek radiowrażliwych i radioopornych największy wpływ na neutralizację ma system związany z glutationem (na poziomie ekspresji transkryptu GSH-GPX. Stosując ten system, możliwe jest także rozróżnienie komórek radioopornych od radiowrażliwych;
- Identyfikacja miRNA, których poziom ulega zmianie w zależności od stężenia  $H_2O_2$ . Autorka proponuje, model trójkąta, w którym zgodnie z Jej propozycją, miRNA wpływają na poziomy RFT poprzez enzymy związane z ich metabolizmem. Dokładniej; RFT (głównie  $H_2O_2$ ) wpływają na poziomy miRNA i wzajemnie na siebie wpływają tworząc pętle sprzężenia zwrotnego, które ilustrują odpowiedzi komórek na warunki środowiskowe (Rysunek 17).

Uważam, że rozprawa jest oryginalnym osiągnięciem naukowym, wnoszącym nowe dane do wiedzy o biologii stanu redoks. odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. Dlatego też chciałbym złożyć wyrazy uznania nie tylko dla Doktorantki, ale i dla Promotorki pracy.

Warto zauważyć, że mgr inż. Sylwia Ciesielska jest współautorką pięciu prac opublikowanych w dobrych wydawnictwach z Listy Filadelfijskiej, z których w dwóch jest autorem pierwszym.

Uwzględniając wartość poznawczą rozprawy, wykazaną w pracy bardzo dobrą znajomość problematyki badań, wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Inżynieria Biomedyczna Politechniki Śląskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Sylwii Ciesielskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Bydgoszcz 30.11.2023*

