

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Adrianny Gielecińskiej pt „Charakterystyka potencjału przeciwnowotworowego kwasu roburowego”

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem promotora dr hab. Renaty Kontek, prof.
UŁ w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Genetyki Wydziału Biologii i Ochrony
Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

Poszukiwanie nowych związków o działaniu przeciwnowotworowym jest wciąż aktualnym celem wielu badań zmierzających do opracowania bardziej skutecznych terapii. W tym nurcie badań szczególne miejsce zajmują związki pochodzenia naturalnego m.in. te produkowane przez rośliny, które wciąż stanowią nie do końca jeszcze poznane źródło cząsteczek o działaniu przeciwnowotworowym. Takich właśnie badań podjęła się mgr Adrianna Gielecińska, która w ramach realizowanego projektu doktorskiego analizowała potencjału przeciwnowotworowy kwasu roburowego.

Rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o spójny tematycznie zestaw publikacji – jednej pracy przeglądowej, 2 prac eksperymentalnych oraz jednego manuskryptu wysłanego do recenzji. Prace zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o wysokim współczynniku oddziaływania (IF od 4,9 do 5,1) i posiadających 140 punktów MEiN każda.

W skład rozprawy doktorskiej, oprócz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, wchodzi autoreferat, obejmujący: informację o źródłach finansowania badań, informację o współpracy naukowej w ramach której były prowadzone badania, spis treści, wykaz skrótów, spis publikacji i manuskryptów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wprowadzenie, cel pracy, hipoteza badawcza, materiał i metody, omówienie publikacji i manuskryptu wchodzącego w skład rozprawy doktorskiej, wnioski, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, bibliografia, spis pozostałych publikacji oraz komunikatów zjazdowych Doktorantki, opis działalności organizacyjnej i promocyjnej mgr Adrianny Gielecińskiej, staże naukowe, kursy, nagrody i wyróżnienia, oświadczenia współautorów prac wchodzących w skład rozprawy oraz publikacje i manuskrypt. Tak podane informacje pozwalają na przeprowadzenie kompleksowej oceny merytorycznej prac będących podstawą rozprawy, ale również umożliwiają lepsze poznanie wyjątkowej aktywności naukowej Doktorantki. Mgr Adrianna Gielecińska jest współautorką 19 publikacji, nie licząc tych, które wchodzi w skład rozprawy doktorskiej. W trzech publikacjach mgr Adrianna Gielecińska jest pierwszym autorem. Zróżnicowana tematyka tych publikacji świadczy o dużej wszechstronności i licznych zainteresowaniach naukowych Doktorantki.

Analizując wkład mgr Adrianny Gielecińskiej w przedstawione do oceny prace, zwraca uwagę bardzo znaczący udział Doktorantki w ich powstaniu, który zgodnie z oświadczeniami współautorów wynosił 70% w przypadku pracy przeglądowej i 80% w dwóch publikacjach oraz manuskrypcie. Ponadto mgr Adrianna Gielecińska jest autorem korespondencyjnym pracy przeglądowej oraz manuskryptu wysłanego do recenzji, co dodatkowo podkreśla jej wiodącą rolę.

Część merytoryczna autoreferatu jest świetnie napisana. Doktorantka bardzo sprawnie nakreśla tło naukowe prowadzonych przez nią badań, uzasadniając jednocześnie potrzebę ich prowadzenia. Ze wstępu dowiadujemy się o istotnym potencjale związków pochodzenia roślinnego wykorzystywanym w farmakologii, a w szczególności ich możliwego działania przeciwnowotworowego. Doktorantka wyjaśnia

również, że transformacja nowotworowa jest procesem wieloetapowym, zależnym nie tylko od mutacji genetycznych, ale także od warunków panujących w mikrośrodkowisku komórki, m.in. przewlekłego stanu zapalnego, stresu oksydacyjnego i zaburzeń odpowiedzi immunologicznej.

Mgr Adrianna Gielecińska zwróciła uwagę na problem ograniczonej skuteczności terapii ukierunkowanych na pojedyncze mechanizmy molekularne i kieruje uwagę Czytelnika na substancje, które mogą jednocześnie wpływać na wiele szlaków regulujących przeżycie, proliferację i śmierć komórek. Przykładem takich związków są triterpenoidy, czyli grupa naturalnych metabolitów roślinnych o szerokim spektrum aktywności biologicznej takich jak kwas roburowy (roburic acid, RA) – tetracykliczny triterpenoid występującym m.in. w galasach dębowych oraz korzeniach roślin z rodzaju *Gentiana*. Dotychczasowe badania wskazują przede wszystkim na jego właściwości przeciwzapalne i antyoksydacyjne, natomiast jego potencjalne działanie przeciwnowotworowe jest znacznie słabiej poznane.

W związku z powyższym mgr Adrianna Gielecińska sformułowała cel swoich badań, którym była wieloaspektowa ocena aktywności biologicznej kwasu roburowego (RA) w komórkach nowotworowych i prawidłowych człowieka.

Doktorantka postawiła hipotezę, że kwas roburowy wywiera zróżnicowany wpływ na komórki nowotworowe i prawidłowe człowieka w układzie *in vitro*, oddziałując na mechanizmy regulujące przeżycie i proliferację komórek.

O ile cel pracy jest jasny i jednoznaczny, to moje wątpliwości budzi sformułowanie hipotezy, która powinna konkretniej definiować spodziewany wynik. Sam fakt "zróżnicowanego wpływu" jest dość enigmatyczny. Odnosząc się do przeprowadzonych badań, hipoteza mogłaby zakładać zależność typu odpowiedzi komórek nowotworowych od stężenia i czasu działania RA lub odmiennego wpływu RA na komórki nowotworowe i prawidłowe.

W dalszej części autoreferatu Doktorantka przedstawiła model eksperymentalny z uwzględnieniem wszystkich linii komórkowych i typów komórek wykorzystywanych w badaniach oraz wymieniła metody, którymi posługiwała się podczas realizacji tego projektu badawczego, dzieląc je w zależności od typu analiz, np. analiza przeżywalności, analiza proliferacji, analiza stresu oksydacyjnego itp. Tak przedstawiony materiał i metodologia pozwalają na sprawne zapoznanie się z wachlarzem narzędzi laboratoryjnych, którymi posłużyła się mgr Adrianna Gielecińska w swojej pracy.

Następnie mgr Adrianna Gielecińska omawia poszczególne prace wchodzące w skład rozprawy.

Jako pierwszą prezentuje pracę przeglądową: Gielecińska A., Kciuk M., Mujwar S., Celik I., Kołat D., Kałuzińska-Kołat Ż., Kontek R., **Substances of Natural Origin in Medicine: Plants vs. Cancer. Cells.** 2023 Mar 23;12(7):986.

Publikacja przedstawia problematykę chorób nowotworowych, ograniczenia współczesnych terapii oraz potencjał związków pochodzenia roślinnego w onkologii. Autorka wskazała na niską selektywność i toksyczność klasycznych cytostatyków oraz rozwój oporności nowotworów, co uzasadnia poszukiwanie nowych substancji terapeutycznych. Szczególną uwagę zwróciła na metabolity roślinne, które mogą jednocześnie oddziaływać na wiele mechanizmów związanych z rozwojem nowotworów, m.in. szlaki przekazywania sygnału, w który zaangażowany jest czynnik transkrypcyjny NF- κ B oraz kinazy PI3K/AKT i MAPK, komórkową odpowiedź na uszkodzenia DNA, apoptozę, autofagię, mikrośrodkowisko guza i

odpowiedź immunologiczną. Szczegółowo omówiła mechanizm działania i wykorzystanie w terapiach paklitakselu i irynotekanu oraz związki pochodzenia naturalnego takie jak kwas betulinowy i resweratrol, które należą do substancji będących przedmiotem licznych badań. Oddzielny podrozdział poświęcony jest kwasowi roburowemu, który jest głównym bohaterem rozprawy doktorskiej. Doktorantka, w oparciu o dostępną literaturę wykazała przeciwwzapalne działanie tego związku obejmujące m.in. ograniczenie produkcji tlenu azotu i IL-6 oraz hamowanie aktywności cyklooksygenaz. Ze względu na związek przewlekłego stanu zapalnego z procesem nowotworzenia RA został uznany za potencjalnie interesujący związek przeciwnowotworowy.

Ta publikacja jest niezwykle obszerna, bogato ilustrowana, prezentująca nie tylko informacje pochodzące z badań klinicznych, ale też bardzo szczegółowo i dogłębnie odśladującą molekularne tajniki działania prezentowanych związków. Biorąc pod uwagę fakt, że mgr Adrianna Gielecińska jest pierwszym i korespondującym autorem tej publikacji, nietrudno się przekonać o niezwykle rozległej wiedzy Doktorantki.

Kolejne dwie publikacje oryginalne - Gielecińska A., Kciuk M., Mujwar S., Schmid J.A., Kontek R. **Anticancer Activity of Roburic Acid: In Vitro and In Silico Investigation.** *International Journal of Molecular Sciences.* 2025; 26 (13):6420. oraz Gielecińska A., Kciuk M., Gruszka R., Wawrocki S., Kontek R. **Roburic Acid as a Therapeutic Candidate: Antiproliferative Activity and Secondary Cell Death Response in Colorectal Cancer Cells.** *International Journal of Molecular Sciences.* 2026; 27 (5):2478 – przedstawiają spójną i dobrze zaplanowaną część eksperymentalną zmierzającą do poznania przeciwnowotworowych właściwości kwasu robirowego.

Pierwsza z wymienionych prac koncentruje się na ocenie potencjału przeciwnowotworowego kwasu robirowego z wykorzystaniem badań *in vitro* oraz analiz *in silico* i próbie odpowiedzi na pytanie czy obserwowane działanie RA wynika z cytotoksyczności, czy raczej z zahamowania proliferacji komórek nowotworowych, a także wskazać możliwe mechanizmy molekularne tego działania.

W badaniach wykorzystano ludzkie komórki linii nowotworowych pochodzące z jelita grubego (3 linie), prostaty oraz trzustki. Wpływ badanego związku na komórki nowotworowe porównywano z jego działaniem na fibroblasty oraz komórki nabłonka jelita grubego (komórki prawidłowe). Wstępna ocena z wykorzystaniem testu MTT oraz komplementarnych testów przeżywalności pozwoliła na określenie wartości IC₅₀ dla poszczególnych typów komórek. Największą wrażliwość na kwas robirowy wykazywały komórki raka jelita grubego, szczególnie linia DLD-1, natomiast komórki prawidłowe były generalnie mniej wrażliwe. Oprócz testów pozwalających określić zmiany w przeżywalności komórek przeprowadzono kilka analiz służących ocenie proliferacji komórek poddanych działaniu RA. Pozwoliło to na stwierdzenie, że kwas robirowy wywiera przede wszystkim efekt cytostatyczny, nie indukując masowej śmierć komórek.

Drugim ważnym aspektem badań była ocena wpływu kwasu robirowego na szlak prowadzący do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, powiązanego m.in. z regulacją procesów zapalnych, proliferacją i przeżyciem komórek. Wykorzystując układ reporterowy NF- κ B, mgr Adrianna Gielecińska wykazała, że RA osłabiał aktywność transkrypcyjną indukowaną przez TNF- α w stopniu zależny od dawki.

Uzupełnieniem badań biologicznych były analizy bioinformatyczne dotyczące właściwości farmakokinetycznych i potencjalnych celów molekularnych RA. Modelowanie wskazało możliwość oddziaływania RA z kilkoma białkami. Szczególne zainteresowanie wzbudziło białko CES1 będące enzymem hydrolitycznym zaangażowanym w metabolizm ksenobiotyków oraz regulację przemian

lipidowych, dla którego symulacje sugerowały stosunkowo stabilne oddziaływanie badanego związku z miejscem aktywnym enzymu.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że RA działa przede wszystkim antyproliferacyjnie, szczególnie wobec komórek raka jelita grubego, a jego aktywność może być związana z modulacją szlaków uczestniczących w procesach zapalnych i nowotworowych, w tym NF- κ B. Jednocześnie wyniki *in silico* wskazały potencjalne dodatkowe cele molekularne, które mogą być zaangażowane w regulację proliferacji i przeżycia komórek.

Głównym celem drugiej publikacji (*Gielecińska A. i wsp.. Roburic Acid as a Therapeutic Candidate: Antiproliferative Activity and Secondary Cell Death Response in Colorectal Cancer Cells. IJMS. 2026; 27 (5):2478*) było wyjaśnienie mechanizmów odpowiedzialnych za zahamowanie proliferacji komórek raka jelita grubego, ze szczególnym uwzględnieniem regulacji cyklu komórkowego, funkcji mitochondriów, stresu oksydacyjnego, integralności DNA oraz apoptozy. W badaniach wykorzystano trzy linie raka jelita grubego. Uzyskane wyniki pozwoliły na potwierdzenie cytostatycznego działania RA. Obserwowano zmniejszenie ekspresji markerów proliferacji, akumulację komórek w fazie G0/G1 i spadek liczby komórek w fazie S, wzrost ekspresji genu *CDKN1A* kodującego inhibitor cyklu komórkowego oraz zahamowanie przechodzenia komórek przez cykl komórkowego. Istotnym odkryciem było wykazanie, że RA stosunkowo wcześniej zaburza funkcjonowanie mitochondriów. Obserwowano zmniejszenie mitochondrialnego potencjału błonowego ($\Delta\Psi$ m) we wszystkich badanych liniach raka jelita grubego. Obserwowanemu spadkowi potencjału nie towarzyszyła śmierć komórkowa, świadcząc o tym, że zaburzenie funkcji mitochondriów prowadzi przede wszystkim do zahamowania proliferacji i syntezy DNA wynikających z zaburzeń produkcji energii przez mitochondria. Dopiero utrzymujący się stres metaboliczny i zaburzenia cyklu komórkowego, szczególnie przy większej ekspozycji na RA, mogą przekraczać zdolności adaptacyjne komórek i prowadzić do wtórnej aktywacji apoptozy. Co ciekawe spadek potencjału błony mitochondrialnej nie prowadził do zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu. Nie wykazano również, stosując test kometowy, indukcji uszkodzeń DNA pod wpływem RA. Brak wyraźnej indukcji ROS i uszkodzeń DNA wskazuje na odmienny od klasycznych genotoksycznych cytostatyków, profil działania RA.

Uzupełnieniem powyższych dwóch publikacji jest dołączony do rozprawy manuskrypt *Gielecińska A, Wawrocki S, Marciniak B, Kciuk M, Wojtczak A, Kontek R. Revisiting Apoptosis: What Lies Behind the Antiproliferative Activity of Roburic Acid in Colorectal Cancer Cells?*. Badania zaprezentowane w tej pracy zmierzały do wyjaśnienia molekularnego mechanizmu cytostatycznego działania kwasu roburowego oraz określenia rodzaju śmierci komórkowej opierając się na wcześniej już analizowanych liniach komórek raka jelita grubego. O ile pytanie o molekularny mechanizm cytostatycznego działania kwasu roburowego jest, z punktu widzenia wcześniejszych, bardzo dobrze udokumentowanych badań, w pełni uzasadnione, o tyle pogłębiona analiza śmierci komórkowej wydaje się mniej istotnym zagadnieniem. Wcześniej omówione wyniki dowiodły bowiem jednoznacznie, że kwas roburowy nie ma działania cytotoksycznego, przynajmniej w stężeniu IC50.

Doktorantka wykazała, że zahamowanie proliferacji pod wpływem działania kwasu roburowego nie jest związane z indukcją starzenia komórkowego. Ta informacja jest bardzo istotna z punktu widzenia potencjalnego wykorzystania tego związku w terapii przeciwnowotworowej.

Pewne wątpliwości budzą wyniki dotyczące poziomu inhibitora cyklu komórkowego, białka p21. Doktorantka wykazała, w oparciu o immunocytochemiczną analizę poziomu białka w komórkach, spadek

poziomu p21 pod wpływem RA. Z drugiej strony nie potwierdziła wzrostu poziomu p21 w komórkach HCT116 pod wpływem doksorubicyny, która w prowadzonych przez mgr Adriannę Gielecińską doświadczeniach służyła jako pozytywna kontrola. Wybór tego związku w celu potwierdzenia indukcji p21 był w pełni uzasadniony, a zatem brak indukcji p21 po podaniu DOX kwestionuje wiarygodność uzyskanego wyniku. Stoi również w sprzeczności z wcześniej uzyskanymi i opublikowanymi przez Doktorantkę wynikami dowodzącymi wzrostu ekspresji *CDKN1A*. W mojej opinii konieczne byłoby przeprowadzenie analizy Western blot aby w sposób ilościowy ocenić poziom analizowanych białek i w efekcie móc wnioskować o potencjalnym mechanizmie działania kwasu roburowego na badane komórki.

Nie zależnie od powyższej uwagi krytycznej wysoko oceniam badania przedstawione we wszystkich trzech pracach oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr Adrianny Gielecińskiej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wszystkie badania były prowadzone na kilku liniach komórkowych i na różnych typach komórek (prawidłowe i nowotworowe). Szereg analiz związanych z określeniem cytotoksyczności kwasu roburowego, jego wpływu na proliferację oraz śmierć komórkową opierało się na różnych, komplementarnych testach dzięki czemu uzyskane wyniki są bardzo wiarygodne. Bardzo wysoko oceniam rzetelność badań i fakt, że Doktorantka nie unikała też prezentowania wyników negatywnych, starając się je odpowiednio zinterpretować. Również dyskusja uzyskanych wyników jest bardzo wyważona, wszechstronna, nie przypisująca jakiejś obserwacji znaczenia większego niż mieć powinna.

Wszystkie uzyskane wyniki zostały podsumowane w autoreferacie w formie dwunastu wniosków, które stanowią syntetyczne i w pełni uzasadnione zwięzłe omówienie owocnej pracy mgr Adrianny Gielecińskiej.

Analizując wyniki przedstawione w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej nasunęło mi się kilka pytań:

- Prosiłabym o wyjaśnienie dlaczego w tekście publikacji (*Gielecińska A. i wsp., Roburic Acid as a Therapeutic Candidate: Antiproliferative Activity and Secondary Cell Death Response in Colorectal Cancer Cells. IJMS. 2026; 27 (5):2478; akapit 2.2 Cell Cycle Analysis*) podane są różne wartości p, która to wartość, w zależności od porównywanej fazy cyklu, komórek i stężenia RA, mieści się w przedziale od 0.0315 do <0.0001. Z kolei na wykresach zamieszczonych na Fig.3A i B istotność statystyczna oznaczona jest tylko jedną gwiazdką przypisaną do $p < 0.05$, bez podziału na przedziały p o niższych wartościach, zwyczajowo oznaczane na wykresach większą liczbą gwiazdek. Tak samo prezentowane są dane na wykresach Fig.4 i 5. ? Jaka była liczebność w poszczególnych, porównywanych grupach eksperymentalnych ?
- Jakie były przesłanki do badania wpływu inhibitorów śmierci komórkowej po 24h, kiedy to, jak pokazały wcześniejsze badania, nie obserwowano zwiększonej frakcji umierających komórek czyli komórek we frakcji subG1, komórek pozytywnych na Aneksynie, komórek charakteryzujących się morfologią typową dla komórek apoptotycznych czy też komórek nekrotycznych ?
- RA powodował wzrost ekspresji *TP53* w komórkach DLD-1, ale jej spadek w HCT-116 i HT-29. Jednocześnie we wszystkich modelach obserwowano zahamowanie proliferacji i wzrost ekspresji *CDKN1A* w określonych warunkach. Czy wyniki te sugerują, że mechanizm zatrzymania cyklu przez RA jest niezależny od p53, ale uczestniczy w nim białko p21 ? Jeżeli tak to jakie inne mechanizmy indukcji ekspresji *CDKN1A* mogą być indukowane przez RA ?

- Jaki może być powód odmiennych wyników uzyskanych w ramach prowadzonych przez Panią badań a tych przedstawionych w pracy Xu H, i wsp., *Roburic Acid Targets TNF to Inhibit the NF- κ B Signaling Pathway and Suppress Human Colorectal Cancer Cell Growth*. Front Immunol. 2022, którzy wykazali, że komórki linii HCT116 i HT29, wykorzystywane również przez Panią, są zdecydowanie bardziej wrażliwe na RA oraz, że związek ten prowadzi do indukcji śmierci komórkowej w stężeniach niższych niż te wykorzystywane w Pani badaniach ?
- Biorąc pod uwagę dane literaturowe dotyczące przeciwnowotworowego działania RA, czy mogłaby Pani wskazać który z uzyskanych wyników uważa Pani za ten, który w sposób najbardziej znaczący wzbogacił istniejący stan wiedzy nad temat badanego związku ?
- Jak, biorąc pod uwagę uzyskane przez Panią wyniki ocenia Pani możliwość wykorzystania RA jako związku przeciwnowotworowego, mając na uwadze fakt że jego działanie ogranicza się przede wszystkim do hamowania proliferacji komórek nowotworowych ? Jakie dalsze badania zaproponowałby Pani, żeby móc zweryfikować przydatność RA w przyszłych terapiach przeciwnowotworowych ?

Chciałbym również przekazać kilka uwag, które nie wymagają komentarza Doktorantki, a jedynie rozważenia przy planowaniu kolejnych badań lub ich opisywaniu:

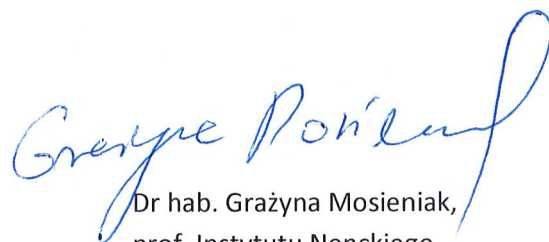
- Analizując poziom białka Ki-67 uważam, że zdecydowanie lepszą, wnoszącą więcej informacji metodą byłoby liczenie komórek Ki-67 +/- . Tak zwykle się robi wykorzystując immunocytochemiczną analizę tego białka jako miarę komórek proliferujących (będących w cyklu).
- Błędnym jest sformułowanie „brak klasycznej aktywacji jądrowej i ograniczenie funkcji transkrypcyjnych tych białek” (wniosek 5.) w odniesieniu do p21 i p53. O funkcji transkrypcyjnej możemy mówić tylko w odniesieniu do p53. Białko p21 nie ma właściwości transaktywacyjnych.
- Niepoprawne jest sformułowanie „aktywność transkrypcyjną szlaku NF- κ B” (wniosek 6.), domyślam się, że chodzi o aktywność transkrypcyjną NF- κ B.
- Również sugerowałabym użycie sformułowania „indukcja apoptozy” zamiast „aktywacja apoptozy” (wniosek 6.)

Wszystkie zawarte w recenzji pytania i komentarze nie umniejszają wagi uzyskanych wyników i bardzo dobrej oceny rozprawy mgr Adrianny Gielecińskiej. Wyniki badań przyczyniają się do lepszego poznania przeciwnowotworowych właściwości kwasu robrowego, stanowiąc mocne podstawy do dalszych badań.

Wkład Doktorantki w część doświadczalną stanowiącą podstawę przedłożonej do recenzji rozprawy był kluczowy dla jej powstania, sama rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego a jej treść potwierdza pogłębioną wiedzę Kandydatki w zakresie przedmiotu.



Stwierdzam więc, że rozprawa doktorska mgr Adrianny Gielecińskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Adrianny Gielecińskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.


Dr hab. Grażyna Mosieniak,
prof. Instytutu Nenckiego

Warszawa, 1.10.2026.