

**Formularz recenzji rozprawy doktorskiej**  
**Rada Dyscypliny Nauki biologiczne**  
**Uniwersytet Jagielloński w Krakowie**

**Imię i nazwisko kandydata:** Izabela Harla

**Tytuł rozprawy doktorskiej:** Odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA wywoływane w warunkach hipoksji oraz ocena skuteczności OCT1002, nowego proleku aktywowanego hipoksją, w indukowaniu dwuniciowych pęknięć DNA

**Promotor:** prof. dr hab. Jerzy Dobrucki

**Promotor pomocniczy:** dr Mirosław Zarębski

**Recenzent:** dr hab. inż. Beata Greb-Markiewicz, prof. PWr

**1. Tematyka rozprawy**

*czy tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy zagadnień istotnych dla rozwoju dyscypliny nauki biologiczne (sugerowane ok. 50-150 słów):*

Hipoksja jest negatywnym czynnikiem prognostycznym efektów leczenia nie tylko za pomocą radioterapii, ale również chirurgii i chemioterapii, co uzasadnia prowadzenie badań nad połączeniem standardowego leczenia onkologicznego z czynnikami ukierunkowanymi na niedotlenienie. Hipoksja przyczynia się nie tylko do zwiększonej oporności guzów litych na leczenie, ale też większej agresywności nowotworów i ich zdolności do tworzenia przerzutów. Standardowe metody leczenia wpływają negatywnie także na zdrowe komórki, co powoduje konieczność opracowania bardziej precyzyjnych terapii. Jednym z takich rozwiązań może być podawanie leku w postaci nieaktywnego prekursora, którego aktywacja odbywa się tylko w warunkach hipoksji, co ogranicza uszkodzenia zdrowych tkanek charakteryzujących się wyższym stężeniem tlenu, z powodu braku aktywacji i przekształcenia proleku do toksycznej formy.

Celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu krótkotrwałej hipoksji na czynniki zaangażowane we wczesną odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA oraz ocena skuteczności indukowania dwuniciowych pęknięć DNA przez OCT1002, prekursora leku aktywowanego w warunkach hipoksji. Pierwszym etapem badań była optymalizacja metod stosowanych w pracy do uzyskania hipoksji. Uszkodzenia DNA indukowano w precyzyjnie wybieranych miejscach jąder komórek za pomocą skupionej wiązki światła o długości 488 nm generowanej przez laser argonowy. Badanie odpowiedzi i oddziaływania wybranych czynników naprawczych w przypadku uszkodzenia DNA w warunkach obniżonego stężenia tlenu realizowano za pomocą metod immunofluorescencyjnych i metody PLA (ang. *Proximity Ligation Assay*). Do oceny skuteczności i bezpieczeństwa stosowania proleku OCT1002 przeprowadzono badania na komórkach HeLa i PC-3 w warunkach normoksji i hipoksji. Zdolność OCT1002 do uszkodzania DNA określano za pomocą fluorescencyjnej wizualizacji miejsc występowania  $\gamma$ H2AX oraz liczby pęknięć DNA wykrywanych metodą dSTRIDE. W wyniku przeprowadzonych badań, opisanych w przedstawionej rozprawie doktorskiej wskazano, że zmiany poziomu stężenia tlenu potencjalnie wpływają na działanie szlaków naprawy uszkodzeń DNA i nawet krótkotrwała hipoksja może prowadzić do ich zaburzenia. Istotne znaczenie ma wykazanie bezpieczeństwa stosowania niskich stężeń OCT1002 (0,1  $\mu$ M) w warunkach normoksji, podczas gdy w warunkach hipoksji te stężenia skutecznie prowadziły do

uszkodzeń DNA szczególnie w przypadku komórek HeLa. W przypadku komórek PC-3, ich duże zróżnicowanie i słaba adhezja prowadziły do częściowej utraty komórek w czasie barwienia w celu wykrycia uszkodzeń DNA i do trudności w analizie danych, prowadząc do wniosku, że praca z tymi komórkami wymaga znacznie większej liczby komórek, co zaproponowano na przyszłość.

Jestem przekonana, że wskazana i omówiona powyżej tematyka pracy i uzyskane w ramach tej pracy wyniki są istotne dla rozwoju dyscypliny nauki biologiczne.

## **2. Wiedza kandydata**

*ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne (sugerowane ok. 50-250 słów):*

W pracy cytowanych jest 194 artykułów naukowych co stanowi dość szeroki przegląd literatury i świadczy o posiadaniu ogólnej wiedzy na dobrym poziomie w obszarze naukowym opisywanym przez doktorantkę. W moim odczuciu zabrakło trochę przeglądu większej liczby prac powstałych w ostatnich latach dotyczących procesów naprawy DNA, na przykład zamiast cytowania Caldecott 2003 lepiej byłoby zacytować Caldecott 2024 („Causes and consequences of DNA single-strand breaks Caldecott, Keith W. Trends in Biochemical Sciences, Volume 49, Issue 1, 68 – 78). We wstępie zabrakło mi też szerszego przedstawienia powszechnie stosowanych metod uzyskiwania warunków hipoksji, co zostało jednak zrobione, dość niespodziewanie dla mnie w ramach dyskusji. Podsumowując uważam że wiedza teoretyczna prezentowana w rozprawie doktorskiej pomimo moich uwag, prezentuje poziom odpowiedni dla kandydatki ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

## **3. Samodzielność kandydata**

*ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora (sugerowane ok. 50-250 słów):*

Sposób napisania rozprawy świadczy o dużej zdolności doktorantki do krytycznego myślenia i dyskusji ograniczeń stosowanych metod i uzyskanych wyników. Na przykład stosując pimonidazol, doktorantka zwróciła uwagę, i przedstawiła powody, dla których analizy oparte na intensywności fluorescencji w preparatach wybarwionych immunofluorescencyjnie mogą nie być wystarczająco precyzyjne. Doktorantka także zwróciła uwagę na potencjalne wystąpienie różnic we wrażliwości poszczególnych typów komórek na działanie COCT1002 oraz istnienie dużej heterogeniczności komórek PC-3 prowadzącej do zróżnicowanej liczby pęknięć DNA. Według mnie świadczy to o wysokim stopniu zrozumienia prowadzonych badań i wykorzystywanych metod oraz dużym poczuciu odpowiedzialności, aby opisując wyniki nie prowadzić do błędnych czy też niepewnych wniosków. Z tego powodu uważam, że w pracy jak najbardziej wykazano zdolność samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez panią Izabelę Harlę.

## **4. Oryginalność rozprawy**

*ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej (sugerowane ok. 100-250 słów):*

Za oryginalne rozwiązanie problemu naukowego uważam analizę liczby powstałych dwuniciowych uszkodzeń DNA w komórkach HeLa i PC-3 co pozwoliło na zbadanie wpływu proleku OCT 1002 na komórki w warunkach normoksji, jako kontrolę bezpieczeństwa stosowania pod kątem selektywności działania, oraz testy w warunkach hipoksji jako sprawdzenie efektywności działania

OCT1002. Wcześniejsze badania przedstawione w literaturze skupiały się na obserwacji zahamowania cyklu komórkowego przez ten prolek. Doktorantka przeprowadziła proces optymalizacji metody uzyskiwania warunków hipoksji podczas obrazowania żywych komórek pod kątem powtarzalności, co pozwoliło na przeprowadzenie nie tylko badań związanych z OCT 1002 ale też dodatkowych badań, jak na przykład sprawdzenie wpływu hipoksji na zdolność do indukcji pęknięć DNA, zdolność białka XRCC1 do wiązania się do miejsc jednoniciowych uszkodzeń, wykrycie zaburzeń oddziaływań pomiędzy wybranymi czynnikami zaangażowanymi w naprawę dwuniciowych uszkodzeń DNA. Doktorantka przeprowadziła porównanie skuteczności metod wykrywania uszkodzeń DNA w warunkach hipoksji metodą dSTRIDE i barwienia immunofluorescencyjnego  $\gamma$ H2AX dyskutując również potencjalne ograniczenia tych metod. Przeprowadzone badania wpisują się w rozwój narzędzi oceny nowych terapii przeciwnowotworowych.

**5. Pytania i/lub uwagi krytyczne, na które Recenzent oczekuje odpowiedzi kandydata w czasie obrony:**

1. Zakładam, że wszystkie przeprowadzone badania w laboratorium zostały wykonane przez mgr Izabelę Harla. Jednak w rozprawie doktorskiej zabrakło mi wyraźnego podkreślenia co jest oryginalnym wkładem/osiągnięciem doktorantki: pomysł, wybór metody?
2. Dlaczego w przypadku OCT1001 prowadzono badania wyłącznie w warunkach normoksji? Zastosowania OCT 1001 jako kontroli pozytywnej w warunkach hipoksji dałoby wg mnie możliwość wglądu w efektywność aktywacji proleku w warunkach hipoksji.
3. Dlaczego w pierwszej części pracy analizowano gromadzenie się białka naprawczego XRCC1 w celu wykrycia uszkodzeń jednoniciowych DNA skoro w części dotyczącej analizy oddziaływań czynników naprawczych oraz w części gdzie badano skuteczność OCT1002 zarówno w komórkach Hela jak i PC-3 analizowano liczbę uszkodzeń dwuniciowych DNA?
4. W rozdziale 8.6.1. Dyskusji, doktorantka zaproponowała występowanie mechanizmu adaptacyjnego w przypadku obniżenia liczby kompleksów Ku70 + p-NBS1. Z ciekawością zapoznałabym się z rozwinięciem tej propozycji.

**6. Inne spostrzeżenia dotyczące treści lub formy rozprawy (opcjonalnie):**

W ramach drobnych uwag dotyczących pracy wymienię, że:

- załączony wykaz skrótów został przygotowany z dbałością o estetykę graficzną, niestety nie zawiera wszystkich skrótów, przy czym czasami zawiera skrót występujący tylko jeden raz, a nie zawiera skrótu występującego częściej, na przykład NHEJ, RFC czy PCNA;
- we wstępie i początkowej części wyników brakuje odniesień do rysunków. Zauważalny także jest brak opisów rysunków pod tytułem rysunku, w tym brak wyjaśnienia skrótów stosowanych na rysunkach;
- pomimo dużej wartości naukowej pracy, została ona napisana w sposób niełatwiający czytania. Zawartość poszczególnych rozdziałów, także w ramach dyskusji zamiast stanowić ciąg, gdzie istnieje połączenie przyczynowo skutkowe ułatwiające czytanie i zrozumienie pracy, często stanowi osobne rozdziały zaczynające się od „Badania polegały na...” zamiast na przykład „W celu...”, „Z powodu...”, „Kontynuując...”, „Porównując...” itp.
- praca zawiera drobne błędy edytorskie typu literówki, pojedyncze słowa nie pasujące do pozostałej części zdania, powtórzenie tytułu podrozdziału w spisie treści, czy czasami pojawiający się żargon np. „metoda  $\gamma$ H2AX”, „toksyna topoizomerazy” czy „podejście enzymatyczne” lub nietypowe określenia np. „słabo intensywny”;
- pozytywnie oceniam dodanie rozdziału 10 (Dodatek) zawierającego tabele przedstawiające wyniki analiz statystycznych wpływu różnych stężeń OCT1001 i OCT1002 na powstawanie

dwuniciowych pęknięć DNA w badanych komórkach, co świadczy o dbałości doktorantki o udostępnienie wszystkich potencjalnie przydatnych informacji.

#### 7. Ocena końcowa:

Pomimo kilku krytycznych uwag, uważam że praca przedstawia wartościowe badania, które obejmują ważne zagadnienia i mają dużą wartość poznawczą. Ponadto jestem przekonana, że badania zostały przeprowadzone bardzo starannie i samodzielnie przez mgr Izabelę Harlę i stanowią istotną podstawę do planowania i prowadzenia dalszych badań pod kątem bardziej efektywnego wykorzystania proleków w terapiach nowotworowych w przyszłości.

Chciałam też zauważyć, o czym nie ma informacji w ramach rozprawy doktorskiej, że doktorantka jest pierwszą autorką publikacji: Harla I, Pawluś W, Zarębski M, Dobrucki JW. Induction of DNA single- and double-strand breaks by excited intra- or extracellular green fluorescent protein. J Photochem Photobiol B. 2024 Oct;259:113001.

Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **Izabeli Harli** 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 Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie **Izabeli Harli** do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

TAK/NIE(\*)

Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

TAK/NIE(\*)

Uzasadnienie wniosku (w przypadku zaznaczenia odpowiedzi TAK)

9.04.2025

.....  
data sporządzenia recenzji

Grebs-Markiewicz  
.....  
podpis recenzenta

#### INFORMACJE:

1. Przygotowanie recenzji wg. niniejszego formularza jest opcjonalne i do decyzji recenzenta pozostaje wybór jej ostatecznej formy.
2. Niezależnie od formy sporządzenia recenzji, recenzent proszony jest o jasne wskazanie oceny spełnienia lub niespełnienia przez kandydatkę/kandydata wymogów określonych w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669) z późniejszymi zmianami (obowiązujący od 7.03.2024-30.09.2024 tekst ujednolicony - Dz. U. 2023 poz. 742).

3. Wniosek o wyróżnienie rozprawy (jeżeli zgłaszany) powinien być jasno sformułowany i uzasadniony.

4. Elektroniczną wersję recenzji należy przesłać na adres: [nauki.biologiczne@uj.edu.pl](mailto:nauki.biologiczne@uj.edu.pl)

5. Równocześnie recenzent proszony jest o przesłanie podpisanego oryginału recenzji na adres:

**Rada Dyscypliny Nauki biologiczne**  
**Dziekanat Wydziału Biologii**  
**Uniwersytet Jagielloński w Krakowie**  
**ul. Gronostajowa 7**  
**30-387 Kraków**

---

(\*) niepotrzebne – skreślić.