ZAKŁAD BIOCHEMII FARMACEUTYCZNEJ
UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU
15-222 Białystok , Mickiewicza 2A
Prof. dr hab. n. med. Marzanna Cechowska-Pasko

Białystok, 08.09.2023.

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt.: ”Wpływ reduktazy karbonylowej 1 na oporność komórek nowotworowych wobec antracyklin” wykonanej przez mgr Kamila Piskę w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Elżbiety Pękala i dr Pauliny Koczurkiewicz-Adamczyk, jako promotora pomocniczego.

Oceniana rozprawa doktorska dotyczy zagadnień związanych z poszukiwaniem mechanizmów, które uczestniczą w zjawisku rozwijania przez komórki nowotworowe oporności na antracykliny. Temat ten, bardzo ważny dla zrozumienia przyczyn niepowodzenia terapii przeciwnowotworowych, nie został wybrany przypadkowo, gdyż Promotor rozprawy, Pani Profesor dr hab. Elżbieta Pękala jest uznanym autorytetem w zakresie badań nad molekularnymi mechanizmami regulacji metabolizmu komórki nowotworowej i ich znaczenia w rozwoju i progresji nowotworów.

Wiadomo, że oporność lekowa w chemioterapii przeciwnowotworowej to ważny problem w dzisiejszej medycynie, który odpowiada za większość nawrotów choroby nowotworowej oraz jest jedną z głównych przyczyn zgonów. Kluczową rolę w mechanizmie oporności lekowej biorą udział geny uczestniczące w regulacji cyklu komórkowego i naprawie DNA. Chemioterapeutyki mogą uszkadzać DNA bezpośrednio, tak jak platyna i jej pochodne, lub pośrednio - inhibitory topoizomerazy, do których należą antracykliny. Są one składnikami wielu schematów w terapii przeciwnowotworowej ze względu na ich szerokie spektrum aktywności i wysoką skuteczność. Jednak aktywność antracyklin jest często obniżana na skutek oporności komórek nowotworowych, co znacznie ogranicza ich potencjał terapeutyczny.

Do głównych przyczyn braku wrażliwości komórek na leki zaliczamy: zmiany w farmakokinetyce (zaburzenia absorpcji, transportu, metabolizmu, eliminacji leku) i farmakodynamice (słaby transport leku do komórki, uszkodzenia białka będącego celem leku, zdolności komórek nowotworowych do zaburzania regulacji procesu apoptozy, zmian w procesach naprawczych DNA a także możliwości aktywnego usuwania cytostatyków z komórki przez błonowe białka transportowe). Ten ostatni mechanizm jest najlepiej poznany, a nieprawidłowa, podwyższona ekspresja białek transportowych jest często opisywanym czynnikiem związanym z opornością nowotworów na cytostatyki. Należą do nich głównie białka transmembranowe z rodziny ABC, zawierające domenę wiążącą ATP. Białka te regulują przepływ aminokwasów, hormonów czy leków poprzez błonę komórkową. Eliminują one z komórki różne związki hydrofobowe, w tym inhibitory topoizomerazy, do których należą antracykliny. Kolejnym mechanizmem powstawania oporności komórek nowotworowych na antybiotyki antracyklinowe jest aktywność katalityczna reduktazy karbonylowej 1. Jest to enzym cytozolowy, należący do grupy krótkołańcuchowych dehydrogenaz, który odgrywa ważną rolę w metabolizmie antracyklin. Pomimo, że potencjał reduktazy karbonylowej 1 jako celu terapeutycznego jest powszechnie uznawany, do tej pory nie przeprowadzono, w szerokim zakresie, badań dotyczących

wpływu aktywności tego enzymu na działanie antracyklin. Podobnie nie opisano zależności pomiędzy aktywnością reduktazy karbonylowej 1 a innymi mechanizmami oporności komórek nowotworowych. Dlatego też potrzebne jest lepsze zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw nabywania lekooporności, które ułatwią opracowanie nowych strategii terapeutycznych i doprowadzą do lepszych wyników klinicznych.

Zatem przedmiot dociekań Doktoranta wpisuje się w nurt współczesnych badań nad opornością komórek nowotworowych, którą uważa się za główną przyczynę niepowodzenia terapii przeciwnowotworowych. Zbadanie mechanizmów, które uczestniczą w zjawisku rozwijania przez komórki nowotworowe oporności na antracykliny jest zatem bardzo istotne, a uzyskane nowe informacje mogą się przyczynić do lepszego zrozumienia biologii komórki nowotworowej, a przez to do opracowania nowych strategii terapeutycznych. Celem postawionym przez Doktoranta była ocena wpływu reduktazy karbonylowej 1 na biotransformację i aktywność przeciwnowotworową wybranych antracyklin. Założony cel pracy został zrealizowany w trzech etapach:

1. porównanie przebiegu biotransformacji ośmiu antracyklin przy udziale reduktazy karbonylowej 1 i wyjaśnienie różnic w aktywności enzymu na poziomie molekularnym,
2. określenie wpływu reduktazy karbonylowej 1 na aktywność badanych antracyklin w komórkach nowotworowych,
3. ustalenie zależności między zależnym od reduktazy karbonylowej 1 metabolizmem antracyklin a zależnym od transporterów ABCB1 wyrzutem leków z komórek nowotworowych.

Tytuł dysertacji Doktoranta został sformułowany prawidłowo i w pełni odzwierciedla cel badań. Wybór tematu pracy doktorskiej uważam za trafny, zgodny z kierunkiem współczesnych badań naukowych i aktualnym stanem wiedzy. Zarówno temat badań jak i model doświadczalny został dobrany właściwie. Badania prowadzone były *in vitro* na komórkach ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc A549 i ludzkich embrionalnych komórkach nerki HEK293T. Podejmowany problem uważam za uzasadniony, niezwykle ważny zarówno z punktu widzenia naukowego, znaczenia medycznego oraz społecznego z uwagi na fakt, iż zbadanie mechanizmów lekooporności może się przyczynić do opracowania nowych strategii terapeutycznych i wydłużenia życia pacjentów onkologicznych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje 109 stron tekstu, 140 pozycji piśmiennictwa oraz 23 ryciny i 17 tabel. Tekst pracy zawiera typowe dla opracowań naukowych rozdziały, z zachowaniem właściwych proporcji. Dodatkowo w pracy zamieszczono wykaz skrótów stosowanych w tekście pracy, co bardzo ułatwia ocenę dysertacji. We wstępie, Autor zamieszcza wyczerpującą charakterystykę antybiotyków antracyklinowych i przedstawia ich budowę chemiczną. Następnie Doktorant opisuje złożone mechanizmy działania przeciwnowotworowego antracyklin: hamowanie topoizomerazy II, interkalowanie DNA oraz generowanie reaktywnych form tlenu, które prowadzą do indukcji programowanej śmierci komórki. W dalszej części Wstępu Autor przedstawia najczęstsze mechanizmy oporności komórek nowotworowych, które bardzo często wykazują obniżoną wrażliwość względem leku, grupy leków lub wielu grup leków stosowanych w terapii. Doktorant bardzo precyzyjnie opisuje mechanizmy oporności komórek nowotworowych na antracykliny, zwracając szczególna uwagę na aktywność katalityczną enzymów uczestniczących w biotransformacji, ze szczególnym uwzględnieniem reduktazy karbonylowej 1, oraz zwiększony wyrzut leków z komórek, w którym pośredniczą transportery z rodziny ABC. Wstęp ilustrowany jest przy pomocy trzech rycin i

jednej tabeli. Uwaga recenzenta odnosi się do definicji reaktywnych form tlenu przedstawionej przez Doktoranta w rozdziale 1.3.3. Nie wszystkie „związki chemiczne tlenu" należą do reaktywnych form tlenu. RFT stanowią produkty elektronowych reakcji cząsteczkowych tlenu, są to rodniki powstałe w wyniku jednoelektronowej reakcji cząsteczek tlenu oraz kolejnych ich przemian, zawierające atomy lub cząsteczki tlenu z niesparowanym elektronem. Ponadto w legendzie do ryciny 2, str. 26, występuje literówka w skrócie reduktazy cytochromu P-450, zamiast CPR - jest „CRP".

Podjęte przez Doktoranta badania, precyzyjne sformułowanie ich celu, zakresu i sposobu przeprowadzenia doświadczeń, uważam za przemyślane. W rozdziale Materiały i Metody przedstawiono w sposób jasny i wyczerpujący techniki badawcze, którymi Doktorant posługiwał się w czasie wykonywania eksperymentów. Techniki te, m.in. hodowle komórkowe, testy oceniające żywotność komórek, testy immunocytochemiczne, analizy metodą LC-MS/MS, dokowanie molekularne, Western blot i mikroskopia fluoroscencyjna są bardzo nowoczesne i właściwie dobrane do celów badawczych, w pełni umożliwiając ich osiągnięcie.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń przedstawione są w sposób przejrzysty na 20 rycinach. Opis wyników doświadczeń jest jasny i pozwala na ich łatwą interpretację. Jednakże w trakcie czytania opisu wyników nasuwają się pytania, które mogą stanowić przedmiot dyskusji podczas obrony tez pracy doktorskiej:

1. Dlaczego wszystkie analizy LC-MS (Ryciny 4-11) umieszczono w rozdziale 3. pt. Materiały i metody a opis do tych wyników znajduje się w punkcie 4.1 rozdziału pt. Wyniki?
2. Dlaczego testy MTT wykonane zostały po 48 h a pozostałe badania tj. akumulacja antracyklin, indukcja apoptozy, po 24 h?
3. W tekście opisującym wyniki brakuje wskazania numerów rycin do których odnoszą się opisy (Ryc. 17, Ryc. 18, Ryc. 19, Ryc. 20).
4. Na Rycinach 17, 18, 19 (strony 66-68) brakuje skali oraz strzałek wskazujących na zmiany morfologiczne charakterystyczne dla procesu apoptozy tj. kondensacja chromatyny czy ciałka apoptotyczne. Legendy do tych rycin nie pozwalają na ich analizę bez czytania opisu do wyników. Na stronie 68 – w legendzie do Ryciny 19 nie zostało podane stężenie antracyklin. Można również zasugerować, że wygodniejsze dla czytającego byłoby, aby przed przygotowaniem publikacji do druku nanieść na rycinach symbole linii komórkowych, które są porównywane oraz skróty poszczególnych antracyklin. Te dane występują w opisach do rycin ale dodatkowe umieszczenie ich bezpośrednio na rycinach znacznie ułatwiłoby czytającemu analizę wyników.
5. W celu zbadania procesu apoptozy w komórkach A549/CBR1 oraz A549/ev użyto tylko technik fluorescencyjnych. Wiadomo, że aby prawidłowo ocenić apoptozę należy zastosować przynajmniej dwie techniki. Oprócz badań fluorescencyjnych proponuję zbadać proces apoptozy metodą cytometrii przepływowej, która pozwala uzyskać bardziej precyzyjne wyniki w porównaniu do technik fluorescencyjnych.
7. Na stronie 71 w opisie wyników, dotyczących żywotności komórek A549/R i A549, poddanych działaniu doxorubicyny i daunorubicyny z klasycznym inhibitorem transporterów ABCB1 walspodarem, została wskazana Rycina 14 choć wyniki te zostały przedstawione na rycinie 22.

Dyskusja zawiera konkluzje do badań przedstawionych w części doświadczalnej oraz dobrze interpretuje uzyskane wyniki badań na tle dostępnych danych piśmiennictwa, dotyczącego podobnych badań prowadzonych przez innych autorów. Doktorant wnikliwie i krytycznie ocenił wyniki własne,

poszukując, w oparciu o dane piśmiennictwa, ich molekularnego uzasadnienia i wytłumaczenia. Rozdział ten świadczy o dojrzałości naukowej Doktoranta oraz o Jego dobrym przygotowaniu teoretycznym i umiejętności interpretacji wyników.

Treść pracy doktorskiej została przedstawiona w postaci 20 kompleksowych rycin zawierających wyniki wielu badań. Uzyskane wyniki pozwoliły Doktorantowi na wyciągnięcie wniosków, logicznie wynikających z przeprowadzonych badań. Odzwierciedlają one najistotniejsze elementy poznawcze pracy. Streszczenie pracy podane jest w języku polskim i angielskim i w sposób syntetyczny przedstawia najważniejsze założenia, wyniki i wnioski płynące z pracy. Rozprawę kończy wykaz prawidłowo dobranego piśmiennictwa, liczący 140 pozycji, z czego zdecydowana większość jest z ostatnich kilku lat.

Podsumowując, wysoko oceniam umiejętności warsztatowe Doktoranta, umiejętność rozwiązywania problemów badawczych, korzystania z piśmiennictwa. Autorowi udało się przeprowadzić nowatorskie badania oceny mechanizmów zaangażowanych w oporność na antracykliny. Z przedstawionych badań wynika, że powinowactwo metabolitów antracyklin do transportera ABCB1, może stanowić jeden z mechanizmów odpowiadających za zmniejszenie cytotoksyczności antybiotyków antracyklinowych pod wpływem ich biotrasformacji, co jest z pewnością istotnym atutem niniejszej dysertacji. Rozprawę doktorską mgr Kamila Piski oceniam wysoko. Stanowi ona niewątpliwie oryginalne, samodzielne rozwiązanie konkretnego problemu badawczego, postawionego przez Doktoranta jako cel badań. Cel ten został zrealizowany w całości, a drobne uwagi recenzenta w niczym nie umniejszają jej rangi. Przedstawione powyżej pytania i uwagi, które pojawiły się w trakcie lektury rozprawy, są przede wszystkim wskazówkami dla Autora, w żadnym stopniu nie obniżają zaś wartości merytorycznej pracy doktorskiej. Praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim w świetle aktualnie obowiązujących przepisów.

Dlatego też z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Kamila Piski 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. 2017 r., poz. 1789 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Kamila Piski do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Jednocześnie, uwzględniając wysoką wartość merytoryczną rozprawy, jej nowatorskie aspekty i ważną poznawczo tematykę wnoszę o jej wyróżnienie.

Prof. dr hab. Marzanna Cechowska-Pasko