Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

Sosnowiec 09.09.2023r.

Dr hab. n .med.
Ilona Bednarek
Prof. SUM

Zakład Biotechnologii
i Inżynierii Genetycznej

Wydział Nauk
Farmaceutycznych
w Sosnowcu

41-200 Sosnowiec,
ul. Jedności 8

Kierownik Zakładu
dr hab. n .med. Ilona
Bednarek Prof. SUM
tel.: (+48 32) 364 12 73
fax: (+48 32) 364 12 76
ibednarek@sum.edu.pl

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

magistra Kamila Piski

rozprawa pt.: "Wpływ reduktazy karbonylowej 1 na oporność komórek nowotworowych wobec antracyklin"

Praca wykonana w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UJ CM
Promotor: prof. dr hab. Elżbieta Pękala
Promotor pomocniczy: dr Paulina Koczurkiewicz-Adamczyk

Informacje ogólne

Podstawą ubiegania się magistra Kamila Piski o stopień naukowy doktora jest opracowana monografia pt., *Wpływ reduktazy karbonylowej 1 na oporność komórek nowotworowych wobec antracyklin* ", która powstała pod kierunkiem Pani Profesor dr hab. Elżbiety Pękala – Promotora pracy, oraz pod opieką Pani dr Pauliny Koczurkiewicz-Adamczyk – Promotora pomocniczego.

Przedstawiona do oceny praca liczy 109 stron i ma typowy dla prac eksperymentalnych układ edytorski. Obejmuje kolejno: Spis treści, Streszczenie, Abstract, Wykaz Skrótów, Wstęp, Cel i Założenia Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i Wnioski, Bibliografię, Wykaz Tabel oraz Wykaz Rycin. Piśmiennictwo liczy 140 pozycji prawidłowo dobranych i cytowanych; 50 pozycji bibliografii to prace z ostatnich 5 lat. W pracy umieszczono 23 ryciny oraz 17 tabel, gdzie tabele i ryciny zdecydowanie ułatwiają analizę treści dysertacji.

Na pierwszych stronach rozprawy doktorskiej podane są również dane dotyczące informacji o źródłach finansowania badań będących podstawą dysertacji (projekty, w których Doktorant jest kierownikiem: projekt NCN - 2017/25/N/NZ7/01382 i projekt subwencji MNiSW dla UJ CM - N42/DBS/000200) oraz informacje o trzech publikacjach, zawierających część problematyki i wyników dysertacji (gdzie Doktorant jest pierwszym autorem w dwóch publikacjach –

DOI:10.1016/j.toxlet.2021.02.001 i DOI:10.1007/s10637-017-0443-2; oraz współautorem w jednej: Postępy Biologii Komórki 2021;48(2): 107-128).

Ocena rozprawy doktorskiej

Zjawisko braku lub utrata wrażliwości komórek na leki od wielu lat stanowi poważny problem w leczeniu szeregu chorób, w szczególności w leczeniu nowotworów. Niewrażliwość komórek nowotworowych na działanie czynników terapeutycznych określana jest, (obok późno postawionej diagnozy), za jedną z głównych przyczyn niepowodzeń terapii i umieralność pacjentów. Aby można było opracować strategie pozwalające przełamać oporność komórek nowotworowych na zastosowaną terapię należy dokładnie poznać mechanizmy prowadzące do powstania zjawiska takiej oporności. Wykazano, że komórki nowotworowe mogą wytworzyć szereg, równolegle biegnących i równocześnie aktywowanych mechanizmów „ucieczki" przed czynnikami terapeutycznymi. W efekcie można zaobserwować zjawisko tak zwanej oporności wielolekowej nowotworów (MDR, ang. *Multidrug Resistance*).

Większość teorii omawiających podstawy mechanizmów MDR opiera się na założeniu istnienia co najmniej dwóch podstawowych klas oporności wielolekowej spotykanych w chorobach nowotworowych. Pierwsza z nich podkreśla jako podstawę zjawiska niemożność osiągnięcia odpowiedniego stężenia terapeutycznego leku w komórkach docelowych. Druga z teorii koncentruje się na zmianach genetycznych i wpływie czynników innych, np. epigenetycznych „zaistniałych" na skutek transformacji nowotworowej i zmieniających wrażliwość komórek na leki. Oprócz leżących u podstaw oporności wielolekowej czynników „komórkowych" mówi się również o wielu tzw. czynnikach środowiskowych w odniesieniu do środowiska samego nowotworu, gdzie pod pojęciem „czynników środowiskowych" rozumie się takie parametry, jak: unaczynienie i geometrię guza oraz odpowiedni gradient ciśnień zapewniający właściwy wychwyt leku z naczyń krwionośnych.

W odniesieniu do „niemożności osiągnięcia stężenia terapeutycznego leku w komórkach", w literaturze podkreśla się, iż w zdecydowanej większości przypadków zjawiska oporności wielolekowej komórek nowotworowych obserwowana jest nadmierna ekspresja genów kodujących transportery błonowe i/lub nieprawidłowości w funkcjonowaniu tych białek. Główną grupą białek transporterowych zaangażowanych m.in. transport leków do i w obrębie komórki są białka należące do nadrodziny ABC (*ang. ATP - Binding Cassette protein*). Typowym przedstawicielem jest białko ABCB1/MDR-1/ tzw. glikoproteina P (*P-gp*). Białka

nadrodziny ABC są bardzo rozpowszechnione w świecie ożywionym. Poza przypuszczalną rolą transporterów ABC w wykształcaniu niewrażliwości na substancje terapeutyczne, pełnią one wiele różnorodnych funkcji fizjologicznych w poszczególnych organizmach. U bakterii np. są one przeważnie powiązane z transportem niezbędnych związków, które nie mogą przedostać się do komórek na drodze dyfuzji (cukry, witaminy, jony metali). W przypadku organizmów eukariotycznych większość transporterów ABC usuwa związki z cytoplazmy na zewnątrz komórki lub przenosi je do wewnątrzkomórkowych kompartmentów (ER, mitochondria, peroksysomy). Ta ostatnia funkcja – „translokacji wewnątrzkomórkowej związków" okaże się równie istotna dla aktywowania zjawiska oporności wielolekowej nowotworów.

Chociaż mechanizmem oporności wielolekowej, który skupił na sobie znaczną uwagę jest proces związany z systemem transportu leków, to zaobserwowano, iż niektóre oporne na leczenie komórki nowotworowe nie wykazują zmienionej ekspresji ABCB1, a jednak charakteryzują się obniżoną wewnątrzkomórkową akumulacją różnorodnych leków. Tak zidentyfikowano rodzinę białek powiązanych z MDR, nazwanych białkami związanymi z opornością wielolekową (MRPs, ang. *Multidrug Resistance Related/Associated Proteins).* Co istotne, zwrócono uwagę na rolę metabolizmu leków przez wybrane białka komórkowe (w tym te powiązane z rodziną MRP) i tym samym powiązano zjawisko MDR tak z transportem leków, jak i ich metabolizmem komórkowym.

Nie można pominąć faktu, że poza wymienionymi białkami zaangażowanymi w zjawisko oporności wielolekowej komórek nowotworowych (białka nadrodziny ABC), podkreśla się znaczenie w rozwoju *Multidrug Resistance* również innych białkowych produktów ekspresji genów. Będą to np. białka kodowane przez geny dla czynników transkrypcyjnych (np. STAT, NANOG, HIF-1), białka kodowane przez geny wykonawcze i regulatorowe cyklu komórkowego czy apoptozy (topoizomeraza I, II, *P53, BCL-2, BAX, BCLX*$_L$), białka zaangażowane w procesy naprawy DNA (MSH-2, MLH-1), produkty ekspresji genów dla białek cytoszkieletu, jak np. białek cytokeratyn (CK) - CK8 lub CK18, czy wreszcie typowe dla danego nowotworu białka, jak np. produkt genu *BCRP* (ang. *Breast Cancer Resistance Protein*).

Złożoność mechanizmów i elementów tworzących zjawisko oporności wielolekowej nowotworów pokazuje, jak istotnym dla osiągnięcia sukcesów w terapii jest ciągłe poszukiwanie nowych rozwiązań tworzących podstawę do opracowania skutecznych strategii omijania MDR.

Biorąc pod uwagę przytoczone fakty zasadność wybranego kierunku badań Doktoranta jest bezsprzeczna. Sam temat dysertacji jest aktualny w świetle prowadzonych na świecie badań naukowych; jest cenny zarówno w aspekcie poznawczym, jak i aplikacyjnym.

Streszczenie rozprawy stanowi dobrze opracowaną syntezę tematu. *Część teoretyczna,* (21 stron tekstu z rycinami i tabelą), przedstawia przegląd informacji na temat charakterystyki antracyklin, z uwzględnieniem ich budowy i mechanizmu działania. W tej części rozprawy umieszczony został również opis zjawiska oporności komórek nowotworowych na chemioterapeutyki, a ostatnim elementem części teoretycznej jest syntetyczne przedstawienie informacji na temat reduktaz karbonylowych wraz z ich powiązaniem ze zjawiskiem MDR.

Przedstawiony *cel i założenia pracy* są sformułowane w sposób przejrzysty; dodatkowo Doktorant wykazał w tej części rozprawy logicznie powiązane ze sobą etapy badań mające posłużyć realizacji założonego celu. Doktorant od porównania przebiegu biotransformacji wybranych antracyklin przy udziale reduktazy karbonylowej podejmuje się zadania wyjaśnienia różnic w aktywności enzymu na poziomie molekularnym; planuje zweryfikowanie wpływu reduktazy karbonylowej na aktywność badanych antracyklin w zdefiniowanym modelu linii komórkowych reprezentujących raka płuca (linia A549 natywna i molekularnie modyfikowana); ostatecznie planuje ustalić zależności pomiędzy zależnym od reduktazy karbonylowej I (CBR1) metabolizmem antracyklin a wyrzutem leków z komórek za pomocą transportera ABCB1.

Rozdział *Materiały i Metody* (18 stron) w sposób wyczerpujący przedstawia zarówno zastosowane materiały jak i metodologię badań. Jest to również rozdział, który już na wstępnie wskazuje na szeroki warsztat badawczy zastosowany przez Doktoranta oraz Jego współpracę z innymi zespołami badawczymi, czy to już na etapie badań *in silico* stosowanych do weryfikacji aktywności/parametrów testowanych leków, czy poprzez badania czynnościowe z wykorzystaniem różnych tworzonych populacji linii komórkowych hodowanych *in vitro*. Doktorant stosuje w swoich analizach specjalnie przygotowane linie komórek raka płuca A549 rekombinowane genetycznie wektorem lentiwirusowym z odpowiednim transgenem, (nadekspresja CBR1), jak i linie komórkowe A549 z indukowaną opornością lekową na testowane antracykliny. Warsztat badawczy Doktoranta to szereg technik instrumentalnych, w tym metody chromatograficzne, analizy spektralne, mikroskopia fluorescencyjna, czy analiza komórek z wykorzystaniem cytometrii przepływowej/sortowania populacji komórkowych. Doktorant m.in. weryfikuje

w badaniach *in vitro* żywotność komórek, indukcję apoptozy, akumulację antracyklin w kompartmentach komórkowych (lizosomalnych), czy aktywność transportera błonowego ABCB1 w obecności testowanych leków (i ich metabolitów).

Przedstawione *Wyniki* zostały opisane szczegółowo na 33 stronach tekstu rozprawy i zostały wzbogacone dokumentacją w postaci rycin, zdjęć poglądowych, wykresów i tabel. Nie sposób nie zauważyć jakże cennej części badań prowadzonych *in silico*, gdzie szczególnie w aspekcie nauk farmaceutycznych wykorzystanie metod chemii kwantowej i przeprowadzenie etapu modelowania molekularnych oddziaływań testowanych antracyklin z centrum aktywnym CBR1 pozwoliło uzyskać szereg ważnych danych, które Doktorant w logiczny i bardzo precyzyjny sposób powiązał z wynikami badań farmakokinetycznych, czy pozostałych wyników z analiz *in vitro* prowadzonych w modelach komórkowych i enzymatycznych.

Doktorant na podstawie przeprowadzonych badań z zakresu biotransformacji i dokowania testowanych antracyklin ustalił, iż dla szybkości biotransformacji analizowanych związków istnieje ścisłe powiązanie z obecnością grupy hydroksylowej w łańcuchu bocznym cząsteczek antracyklin; co istotne, owa grupa hydroksylowa i efekty elektronowe potencjalnie obniżają podatność antracyklin na zależną od reduktazy karbonylowej 1 redukcję ugrupowania karbonylowego. Wyniki uzyskane w oparciu o testy prowadzone na modyfikowanej linii A549 z nadekspresją CBR1 wykazały wpływ reduktazy karbonylowej 1 tak na procesy biotransformacji antracyklin, jak i ich profil dystrybucji komórkowej „kierując" pulę wybranych antracyklin do lizosomów. To natomiast można było wiązać tak z opornością komórek na antracykliny, jak i odpowiednią zmianą aktywacji programowanej śmierci komórek. Część wyników badań poświęconych bezpośrednio ocenie aktywności transportera ABCB1 wykazała, że zarówno antracykliny, jak i ich metabolity są substratami dla wspomnianego białka transporterowego. Ważnym osiągnięciem w przedstawionej części badawczej pracy Doktoranta było spostrzeżenie, iż w wybranych wypadkach powstające na drodze zależnej od CBR1 biotransformacji metabolity antracyklin są wysoce podatne na tzw. efluks komórkowy. Tym samym obserwujemy zmniejszoną pulę leku w komórkach, co wprost możemy powiązać z rolą tak transportera ABCB1, jak i aktywności reduktazy karbonylowej 1 z wytworzeniem się oporności komórek nowotworowych na antracykliny.

Dyskusja przedstawiona na 17 stronach manuskryptu jest bardzo dobrą i dokładną analizą otrzymanych wyników jak i ich odniesieniem do danych literaturowych. Umiejętna konfrontacja uzyskanych wyników z aktualnymi danymi

literaturowymi i wysunięcie odpowiednich *wniosków* świadczy o dobrej znajomości literatury przedmiotu i podjętego problemu badawczego przez Doktoranta.

Analizując tekst manuskryptu rozprawy doktorskiej nie znaleziono istotnych błędów edytorskich, nie mniej jednak z racji obowiązku jestem zmuszona zwrócić uwagę na fakt, że *Streptomyces* to promieniowce, a nie jak Doktorant dwukrotnie (str.17 i str. 18), wspomina w rozprawie pisząc, iż są to promienice!. Jedynie sporadycznie pojawiają się błędy zapisu poszczególnych wyrazów.

Wymienione powyżej uwagi nie wpływają w żadnym stopniu na wartość merytoryczną pracy i jej całościową ocenę.

Całość rozprawy opracowana została w sposób estetyczny i napisana została poprawnym językiem naukowym.

Bardzo wysoko oceniam wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pana Magistra Kamila Piski. W mojej ocenie założone cele badawcze zostały zrealizowane, zaś otrzymane wyniki są nowatorskie i skłaniają do dalszych badań nad mechanizmami oporności na antracykliny oraz możliwościami opracowania rozwiązań w obowiązujących protokołach leczenia nowotworów.

Podczas lektury opracowanej monografii rozprawy nasunęło mi się kilka drobnych pytań/uwag, które przedstawiam poniżej.

1. Co było podstawą wyboru linii komórkowej A549 reprezentującej typ niedrobnokomórkowego raka płuca do prowadzonych badań?

2. Linia A549 charakteryzuje się specyficznym proteomem, w tym poziomem ekspresji topoizomerazy II. Jakie może mieć to wpływ na wyniki związane z określeniem aktywności testowanych antracyklin?

3. Które z innych białek eksprymowanych typowo dla zdefiniowanej linii komórkowej A549 mogły wpłynąć na modulowanie zjawiska oporności wielolekowej w obecności testowanych antracyklin?

4. Jak wygląda odniesienie zastosowanych stężeń w prowadzonych badaniach typu „*in vitro*" testowanych antracyklin do dawek stosowanych w terapii rzeczywistej pacjentów? Czy można te dane odpowiednio powiązać?

5. Jakie inne strategie, obok stosowania tzw. chemouczulaczy, mogą mieć zastosowanie w omijaniu oporności wielolekowej w terapii nowotworów, w tym w terapii przy użyciu antracyklin?

Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

Podsumowanie

Prezentowana dysertacja pt.: "*Wpływ reduktazy karbonylowej 1 na oporność komórek nowotworowych wobec antracyklin*" wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktoranta – Pana magistra Kamila Piski, Jego umiejętność planowania i przeprowadzania złożonych eksperymentów, tak tych *in silico*, jak i *in vitro* z wykorzystaniem szeregu modeli badawczych: komórkowych i białkowo-enzymatycznych. Przedłożona rozprawa potwierdza również dojrzałość naukową Doktoranta, Jego zdolność trafnej analizy otrzymanych wyników i ich interpretacji.

W podsumowaniu stwierdzam, iż rozprawa doktorska Pana magistra Kamila Piski spełnia warunki określone w art.13 ust.1 z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017r., poz. 1789 z późn. zm.). Wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UJ w Krakowie o dopuszczenie magistra Kamila Piski do dalszych etapów w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Równocześnie przedkładam wniosek wraz z uzasadnieniem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej przez Radę Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UJ.

KIEROWNIK
Zakładu Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
dr hab. n. med. Ilona Bednarek, prof. SUM

dr hab. n. med. Ilona Bednarek prof. SUM