Katowice. 30.06.2023 r.

Katedra i Zakład Chemii
i Analizy leków

Wydział Nauk Farmaceutycznych
w Sosnowcu

Śląski
Uniwersytet Medyczny
w Katowicach

ul. Jagiellońska 4
41-200 Sosnowiec
www.chemialekow.sum.edu.pl

Dr hab. n. farm.
Jakub Rok
jrok@sum.edu.pl
tel.: (+48 32) 364 15 47

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 364 16 11

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Ocena rozprawy doktorskiej pt.:

**Mechanizm pro-apoptotycznego działania cholekalcytriolu i menandionu w komórkach melanomy**

wykonanej przez

**mgr Pawła Szokę**

w Zakładzie Analizy i Bioanalizy Leków oraz Zakładzie Chemii Leków
Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
pod kierunkiem:
prof. dr hab. n. farm. Wojciecha Miltyka oraz dr hab. n. farm. Ilony Ościłowskiej

*Podstawa formalna wykonania recenzji: Uchwała nr 158/2023 Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z dnia 30.05.2023 r. w sprawie wyboru recenzentów, komisji doktorskiej, komisji egzaminacyjnej i ustalenia zakresu egzaminów doktorskich mgr Pawła Łukasza Szoki.*

Opracowanie skutecznej i bezpiecznej terapii czerniaka jest jednym z głównych wyzwań współczesnej onkologii i farmakologii. Czerniak to nowotwór skóry wywodzący się z wyspecjalizowanych komórek barwnikowych – melanocytów, zlokalizowanych w warstwie podstawnej naskórka. Statystyki wskazują, że czerniak stanowi około 2% zachorowań na nowotwory w Polsce, przy czym wciąż obserwuje się dynamiczny wzrost zachorowalności na ten rodzaj nowotworu (wzrost o około 10% rocznie). W naszym kraju aktualnie diagnozuje się ponad 3000 nowych przypadków rocznie. Należy przy tym podkreślić, że u ludzi rasy kaukaskiej czerniak jest najbardziej złośliwym spośród wszystkich nowotworów skóry. W ostatnich latach odnotowuje się zmniejszenie umieralności z powodu czerniaka, głównie za sprawą wprowadzenia nowych metod leczenia opartych na immunoterapii oraz terapii celowanej molekularnie. Jednakże ich skuteczność oraz bezpieczeństwo wciąż nie są w pełni satysfakcjonujące. Z tego powodu wciąż podejmowane są próby poszukiwania innowacyjnych metod terapii, które uwzględniają zarówno syntezę nowych związków chemicznych, jak i repozycjonowanie znanych i obecnie stosowanych leków.

Recenzowana rozprawa doktorska wskazuje na możliwość wykorzystania cholekalcytriolu i menandionu w terapii czerniaka, a zatem stanowi próbę rozwiązania aktualnych i istotnych problemów farmakoterapii onkologicznej. Doktorant w swojej pracy nie tylko wykazał przeciwnowotworowy potencjał obu substancji wobec komórek czerniaka, lecz także przeprowadził szereg badań pozwalających na zaproponowanie mechanizmu działania.

Praca doktorska Pana magistra Pawła Szoki została wykonana w Zakładzie Analizy i Bioanalizy Leków oraz Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Promotorem rozprawy jest Pan prof. dr hab. n. farm. Wojciech Miltyk, a Pani dr hab. n. farm. Ilona Ościłowska pełniła rolę promotora pomocniczego.

Rozprawa doktorska Pana magistra Pawła Szoki obejmuje 85 stron, na które składają się: strona tytułowa, spis treści, wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, opis stosowanych metod badawczych, wyniki, dyskusja, wnioski, wykaz rycin i tabel, informacja dotycząca zgody Komisji Bioetycznej, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bibliografia. Można zatem stwierdzić, że zasadnicza struktura pracy jest prawidłowa i spełnia wszystkie wymagania dla tego typu opracowań naukowych.

Wstęp pracy liczy 26 stron i został opracowany na podstawie 141 pozycji literaturowych. W ramach tej części rozprawy Autor przedstawił informacje na temat czerniaka skóry oraz właściwości witaminy D i witaminy K. Zaprezentowana charakterystyka witamin obejmuje ich występowanie, metabolizm, mechanizmy działania, zapotrzebowanie oraz skutki niedoboru. Pan Magister opisał także biologiczne i farmakologiczne właściwości badanych substancji, wskazując przy tym na ich aktywność przeciwnowotworową. Dalsza część wstępu dotyczy molekularnego podłoża apoptozy i autofagii, ze szczególnym uwzględnieniem roli dehydrogenazy prolinowej/oksydazy prolinowej (PRODH/POX) w przebiegu tych procesów. Doktorant podkreślił także znaczenie prolidazy i biosyntezy kolagenu w regulacji dostępności proliny, co ma istotne znaczenie dla funkcji zależnych od PRODH/POX. Należy podkreślić, że najważniejsze informacje dotyczące dehydrogenazy prolinowej/oksydazy prolinowej oraz prolidazy zostały dodatkowo podsumowane na schematach graficznych (rycina 7 i 9), które ułatwiają zrozumienie przekazanych treści. Podsumowując, należy stwierdzić, że wstęp pracy został napisany rzeczowo oraz poprawnie pod kątem merytorycznym i językowym. W całości stanowi gruntowne wprowadzenie w problematykę wykonanych badań.

Nadrzędnym celem recenzowanej pracy była ocena mechanizmu działania cholekalcytriolu (witaminy $D_3$) i menadionu (witaminy $K_3$) w aspekcie indukcji procesu apoptozy w komórkach czerniaka i fibroblastach skóry ludzkiej. Cel został sformułowany w oparciu o hipotezę wskazującą na zdolność analizowanych witamin do pobudzenia ekspresji dehydrogenazy prolinowej/oksydazy prolinowej, która poprzez generowanie reaktywnych form tlenu przyczynia się do indukcji apoptozy. Aby zrealizować postawione zadanie, Doktorant zaplanował panel eksperymentalny, na który składały się badania przeżywalności komórek, integralności błon komórkowych i aktywności prolidazy oraz analizy biosyntezy DNA i kolagenu. W ramach realizacji celu pracy zbadano

także ekspresję dehydrogenazy prolinowej/oksydazy prolinowej oraz dokonano oceny poziomu reaktywnych form tlenu i wybranych markerów apoptozy i autofagii. W mojej opinii, cel pracy został sformułowany w sposób precyzyjny, a dobór badań i analiz nie budzi zastrzeżeń i w pełni pozwala uzyskać odpowiedź na postawione pytanie naukowe.

W przeprowadzonych badaniach Doktorant wykorzystał komórki czerniaka amelanotycznego linii C32. Na szczególne podkreślenie zasługuje równoległe prowadzenie eksperymentów z wykorzystaniem fibroblastów ludzkich. Wykorzystanie prawidłowych komórek skóry pozwoliło na wstępną ocenę bezpieczeństwa analizowanej terapii. Dodatkowo, uwzględniając, że fibroblasty skóry ludzkiej nie wykazują ekspresji dehydrogenazy prolinowej/oksydazy prolinowej, należy uznać niezwykłą trafność wyboru komórek referencyjnych z punktu widzenia przyjętej hipotezy.

Szczegółowy opis stosowanych metod eksperymentalnych, zawarty w rozdziale 3, pozwala stwierdzić, że wszystkie badania wykonano prawidłowo. Przeprowadzone analizy uwzględniały techniki oparte na: pomiarach absorbancji i fluorescencji, detekcji scyncylacyjnej, elektroforezie oraz immunodetekcji Western Blot. Do pomiaru wewnątrzkomórkowego stężenia proliny wykorzystano z kolei wysokosprawną chromatografię cieczową HPLC w połączeniu z detektorem spektrometrii mas QTOF. Tak szeroki zakres technik i metod badawczych wskazuje na kompleksowe i wielokierunkowe spojrzenie Doktoranta na kwestię rozwiązania problemu badawczego, co bezsprzecznie stanowi atut niniejszej pracy.

Otrzymane wyniki zaprezentowano w rozdziale 4, który obejmuje 15 stron pracy doktorskiej. Opis wyników jest zwięzły i rzeczowy. Doktorant przygotowując tę część rozprawy skupił się na najważniejszych obserwacjach, co przyczynia się do łatwiejszego odbioru omawianych zagadnień. Opisowi wyników towarzyszy w sumie 20 rycin, z czego 12 przedstawia reprezentatywne wyniki analizy Western Blot. W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę, iż wykonanie dodatkowo pomiarów densytometrycznych i zobrazowanie wyników analizy Western Blot, także w formie wykresów słupkowych, w niektórych przypadkach ułatwiłoby analizę i interpretację wyników. W pracy nie uwzględniono również analizy białek referencyjnych, takich jak GAPDH, β-aktyna czy też α-tubulina.

Rozdział 5 rozprawy doktorskiej, czyli dyskusja, rozpoczyna się krótkim i rzeczowym podsumowaniem przeprowadzonych badań. Doktorant stwierdza, iż mechanizm przeciwnowotworowego działania witaminy $D_3$ i $K_3$ wobec komórek czerniaka C32 polega na indukcji PRODH/POX oraz związanego z aktywnością tego enzymu wytwarzania reaktywnych form tlenu, które z kolei przyczyniają się do aktywacji procesu apoptozy. Podkreślone zostaje przy tym istotne znaczenie wysokiej ekspresji omawianego enzymu oraz dostępności jego substratu, czyli proliny. Omawiając szerzej przeciwnowotworowy potencjał cholekalcytriolu, Autor wskazuje ważną rolę indukcji kinazy AMP, inhibicji biosyntezy kolagenu oraz udziału badanej substancji w zmianach metabolicznych w komórkach czerniaka. Pragnę w tym miejscu podkreślić, że Pan magister w niezwykle ciekawy sposób przedstawił ewolucyjne aspekty działania witaminy $D_3$, które połączył m.in. ze zmianami funkcji receptorów jądrowych dla witaminy $D_3$ – VDR. Podsumowując należy

zaznaczyć, że dyskusja rozprawy doktorskiej jest wysoce przemyślana. Doktorant dokonuje syntezy otrzymanych wyników i omawia je w szerokim zakresie, uwzględniając wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnalizacyjne, przemiany biochemiczne i zmiany metaboliczne, także dotyczące macierzy zewnątrzkomórkowej. Świadczy to o dużej dojrzałości naukowej oraz dogłębnym zrozumieniu omawianej problematyki.

Na podstawie otrzymanych wyników Pan magister Paweł Szoka w sposób prawidłowy sformułował siedem wniosków. Konkluzje są rzeczowe, precyzyjne i odnoszą się do poszczególnych etapów prowadzonych badań oraz analizowanych procesów. Rozdział 6, prezentujący wnioski, kończy się krótkim podsumowaniem oraz graficznym przedstawieniem proponowanego mechanizmu apoptozy indukowanej przez witaminę $D_3$ i $K_3$ w komórkach czerniaka. Bibliografia recenzowanej rozprawy doktorskiej obejmuje aż 183 pozycje literaturowe, z czego ponad 80% to artykuły anglojęzyczne.

Opierając się na przedstawionym materiale wynikowym oraz opracowaniu teoretycznym poruszanych zagadnień, korzystając jednocześnie z przywileju recenzenta, pragnę przedstawić kilka zagadnień, które mogą stanowić element dalszej dyskusji:

1. W trakcie realizacji badań, Doktorant stwierdził, że cholekalcytriol i menadion indukują apoptozę poprzez aktywację szlaku wewnątrzpochodnego. Czy na podstawie danych literaturowych można wysnuć przypuszczenie, że badane substancje mogą być zdolne do indukcji apoptozy w komórkach czerniaka za pośrednictwem szlaku zewnątrzpochodnego?
2. Cholekalcytriol jest substancją o wielokierunkowej aktywności biologicznej, co wynika między innymi z mechanizmu działania za pośrednictwem receptorów jądrowych VDR. Czy zaobserwowano do tej pory różnice w ekspresji tego receptora pomiędzy komórkami prawidłowymi
   i nowotworowymi, uwzględniając w tym komórki czerniaka?
3. Dostępność dużej liczby linii ciągłych czerniaka, pojawia się pytanie o kryteria jakie przyjął Doktorant wybierając linię C32. Czy w trakcie realizacji badań rozważano wykorzystanie komórek czerniaka melanotycznego?
4. Mając na uwadze aktualny stan wiedzy oraz perspektywę kontynuacji badań, proszę o wskazanie markerów lub cech biochemicznych i molekularnych, które wskazywałyby na wrażliwość komórek nowotworowych na działanie że cholekalcytriol i menadionu.

Podsumowując, stwierdzam, iż przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została napisana rzetelnie, szczegółowo i zgodnie z obowiązującymi zasadami redagowania tego typu publikacji. Praca została starannie zredagowana i napisana poprawnym językiem, z wykorzystaniem właściwej terminologii naukowej. Doktorant dokonał gruntownego przeglądu literatury, co znajduje odzwierciedlenie w informacjach przedstawionych we wstępie oraz w dyskusji. W mojej opinii,

tematyka doktoratu jest nowatorska, a kierunek badań wpisuje się w aktualny trend poszukiwania nowych, skutecznych metod leczenia chorób nowotworowych.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana praca w całości spełnia wymagania ustawowe stawiane rozprawom na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, zgodnie z art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1798 ze zm.) i wnoszę wniosek do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o jej przyjęcie i dopuszczenie Pana mgr Pawła Szoki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*dr hab. n. farm. Jakub Rok*

jrok Elektronicznie podpisany przez jrok Data: 2023.06.30 14:32:42 +02'00'