UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką
ul. Chodźki 4A (Collegium Pharmaceuticum), 20-093 Lublin
tel. (081) 448 7250

Recenzja pracy doktorskiej
p.t. „Ocena aktywności przeciwnowotworowej inhibitora kinazy Brutona i erytropoetyny w komórkach ludzkiego gruczolaka piersi" wykonanej przez mgr Dariusza Rożkiewicza na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Dariusza Pawlaka z Zakładu Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku Promotor pomocniczy: dr hab. n. farm. Justyna Hermanowicz z Zakładu Farmacji Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny jest poszukiwanie nowych, skutecznych i bezpiecznych leków przeciwnowotworowcyh w tym także tzw. leków celowanych, czyli swoistych inhibitorów białek odgrywających rolę w procesie nowotworzenia, związków, które byłyby swoistymi inhibitorami komórkowych mechanizmów patogenetycznych nowotworów. Przeprowadza się także badania nad analogami znanych już leków, czy też określa potencjał działania onkostatycznego nowozsyntezowanych pochodnych i potencjalne punkty uchwytu ich działania. W tym aspekcie, ciągle poszukuje się także nowych inhibitorów kinaz tyrozynowych, wykazujących zdolność do jednoczesnego hamowania wielu onkogennych kinaz. Również rozwiązanie problemu lekooporności może leżeć u podstaw koncepcji polifarmakologii, opierającej się na oddziaływaniu cząsteczek leków z wieloma różnymi celami molekularnymi. Konieczne staje się więc głębsze zrozumienie efektów mogących

odpowiadać za zróżnicowanie oddziaływań pomiędzy białkami i ligandem. Wprowadzenie inhibitorów kinazy tyrozynowej Brutona (BTK) uznać więc można za jeden z kamieni milowych w leczeniu nowotworów B-komórkowych ze względu na ich wysoką skuteczność oraz doustne stosowanie. Pierwszym przedstawicielem tej klasy leków jest ibrutynib, zrejestrowany w 2013r. Inhibitory kinaz białkowych są znanymi lekami przeciwnowotworowymi, i od lat prowadzone są w tym zakresie intensywne badania zarówno podstawowe jak i wdrożeniowe, ciągle poszukuje się nowych inhibitorów kinaz tyrozynowych, wykazujących zdolność do jednoczesnego hamowania wielu onkogennych kinaz kluczowych dla regulacji cyklu życiowego komórek. Wspomniany już ibrutynib blokuje przykładowo także receptor EGFR i HER2 prowadząc do zwiększonej apoptozy komórek raka piersi.

Rozprawa doktorska opracowana przez pana mgr Dariusza Rożkiewicza poświęcona jest właśnie tym zagadnieniom. Stanowi ją monotematyczny cykl 2 prac opublikowanych w specjalistycznych czasopismach z listy filadelfijskiej takich jak: Molecules (2023, praca przeglądowa) oraz J Enzyme Inhib Med Chem (2020). Łączna wartości współczynnika wpływu tych prac wynosi 9.978 (280 pkt. MNiSW). Zważywszy na fakt, iż prace te przed opublikowaniem, zgodnie z wymogami redakcji, zostały już ocenione przez kilku ekspertów w danej dziedzinie, trudno wiec dopatrywać się w ich ewentualnych niedociągnięć lub uwag merytorycznych. Analizując dołączone kopie publikacji stwierdzam, iż są to prace wieloautorskie (z Promotorami jako jednymi ze współautorów), we wszystkich Doktorant jest pierwszym autorem.

Należy podkreślić, iż dodatkowo do dokumentacji dołączono podpisane oświadczenia współautorów i samego Doktoranta, wskazujące na ich wkład w powstawanie poszczególnych publikacji, z opisem realizowanych zadań (w przypadku Doktoranta podał on także udział procentowy udziału w ich powstawaniu, szacowany na 60%). Uważam więc dokumentację przedstawioną do wglądu recenzentom za kompletną.

Układ dysertacji doktorskiej jest typowy dla tego typu prac. Autor obok kopii wspomnianych publikacji zamieścił wprowadzenie z właściwie i precyzyjnie określonym celem podjętej tematyki, opis materiałów i metod, podsumowanie wyników i dyskusję, właściwie wyszczególnione wnioski. Dołączono także streszczenia w języku polskim i angielskim oraz informacje o dorobku naukowym Doktoranta, w sumie całość na 75 stronach wydruku.

Cel pracy opiera się na i) poszukiwaniu aktywności przeciwnowotworowej związku LFM-A13, inhibitora kinazy tyrozynowej Brutona stosowanego głównie w leczeniu białaczek oraz erytropoetyny (Epo) wobec komórek raka piersi biorąc pod uwagę dane literaturowe świadczące o możliwości nasilenia aktywności przeciwnowotworowej inhibitora BTK podawanego łącznie z Epo w raku okrężnicy, w warunkach *in vivo* i *in vitro;* ii) określeniu żywotności estrogenozależnych i estorgenoniezależnych komórek raka piersi po ekspozycji na LFM-A13 i Epo; iii) opisaniu wpływu obu związków na procesu apoptozy i cykl komórkowy; iv) określenie udziału BTK w mechanizmie działania LFM-A13 i Epo. Zastosowano nowatorskie metody badawcze w tym badania na w/w komórkach raka piersi uzyskanych z Amerykańskich Kolekcji Hodowli Komórkowych, metodę cytometrii przepływowej, mikroskopię konfokalną, metodę Western Blot, badanie histopatologiczne i

immunohistochemiczne wycinków nowotworów piersi pobranych śródoperacyjnie oraz model Danio rerio (embriony).

Za najważniejsze osiągnięcia naukowe opublikowane w drugiej, eksperymentalnej pracy z cyklu uznać można m.in. i) wykazanie, iż skojarzone zastosowanie LFM-A13 oraz Epo skutkuje działaniem antyproliferacyjnym wobec estrogenozależnych i estorgenoniezależnych komórek raka piersi i indukuje w nich procesy apoptozy hamując proliferację. Autorzy wysnuli wiec wniosek, iż Epo działać może jako chemosensibilizator w komórkach raka piersi; ii) w modelu Danio rerio potwierdzono w/opisany efekt obserwując zmniejszenie liczby komórek obu implantowanych linii po inkubacji z LFM-A13 i Epo; iii) wykazanie aberracji mitotycznych i wykształcenie nieprawidłowych wrzecion kariokinetycznych zaburzających mitozę i cykl komórkowy tych komórek nowotorworowych; iv) wykazanie, iż LMF-A13 hamuje aktywność BTK, a efekt ten jest nasilany przez Epo. Podsumowując, Autorzy wykazali, iż łączne podanie inhibitora BTK z Epo efektywnie hamuje wzrost nowotworu przez nasilenie procesów apoptozy na drodze utraty potencjału błony mitochondrialnej. Badania te mogą przyczynić się do podjęcia dalszych badań przedklinicznych nad efektywnym leczeniem raka piersi i opracowaniem optymalnych strategii terapeutycznych, w tym zakładających łączne podanie inhibitorów BTK i Epo lub innych czynników wzrostowych.

Jeśli chodzi o stronę techniczną, graficzną, edytorską i językową, to rozprawa jest starannie zredagowana, jej język i terminologia naukowa poprawne. Piśmiennictwo, odpowiednio dobrane i aktualne, zostało zacytowane właściwie. Dowodzi to właściwego warsztatu naukowego Doktoranta i jego przygotowania do redagowania prac naukowych.

W podsumowaniu chcę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa będąca spójnym tematycznie cyklem dwóch opublikowanych prac łącznie z ich omówieniem, dotyczy bardzo ważnego, nie do końca poznanego, ale i trudnego tematu badawczego. Eksperymenty zaplanowano, wykonano i opisano starannie, a prace dołączone do monotematycznego cyklu posiadają dużą wartość naukową. Dojrzałe merytorycznie omówienie wyników stanowiących podstawę poszczególnych publikacji ma charakter ogólny i dobrze odnosi otrzymane wyniki do współczesnej wiedzy. Praca niesie istotne i nowe treści, a oryginalne wyniki, dotyczące potencjalnie korzystnych powiązań, także z klinicznego punktu widzenia, będą bardzo przydatne dla farmakologów (i onkologów-klinicystów) poruszających się w obrębie analizowanej tematyki badań związanej z jeszcze bardziej skuteczną i bezpieczniejszą polichemioterapią chorób nowotworowych, w tym raka piersi. Mogą się także przyczynić do zaprojektowania nowych, skutecznych strategii terapeutycznych. Podjęte przez Pana **mgr Dariusza Rożkiewicza** badania, precyzyjne sformułowanie ich celu, zakresu i sposobu przeprowadzenia doświadczeń wraz z dokonaniem przeglądu literaturowego w pierwszej pracy uważam za przemyślane. W świetle przytoczonych przez Doktoranta danych podjęty temat dysertacji jest wysoce uzasadniony i wnosi wiele nowych elementów o charakterze poznawczym i wdrożeniowym.

Podsumowując, rozprawę doktorską pana **mgr Dariusz Rożkiewicza** p.t. „Ocena aktywności przeciwnowotworowej inhibitora kinazy Brutona i erytropoetyny w komórkach ludzkiego gruczolaka piersi", wykonaną pod kierunkiem pana Promotora, prof. dr hab. n. med. Dariusza Pawlaka z Zakładu Farmakodynamiki i dr hab. n. farm. Justynę Hermanowicz, Promotora pomocniczego, z Zakładu Farmacji Klinicznej, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, oceniam wysoko.

Rozprawa spełnia ustawowe warunki o stopniach naukowych i tytule naukowym zawarte w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.). Wnioskuję do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie pana **mgr Dariusza Rożkiewicza** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 17. 07. 2023