



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

**Recenzja Pracy Doktorskiej p. mgr Anny Czajkowskiej,
pt. „Ocena skojarzonego działania oleju z nasion czarnuszki siewnej
Nigella sativa z nowym analogiem alkaloidów izochinolinowych na
proces apoptozy w komórkach raka żołądka AGS”**

Przedłożona do oceny praca doktorska pani magister Anny Czajkowskiej została wykonana w Zakładzie Biotechnologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, pod kierownictwem Promotora, pani prof. dr hab. Anny Bielawskiej oraz Promotora pomocniczego, pani dr Agnieszki Gornowicz.

Badania objęte doktoratem były prowadzone we współpracy z Instytutem Chemii Organicznej PAN w Warszawie oraz z Wydziałem Chemii Brooklyn College The City University of New York, gdzie Doktorantka odbyła staż naukowy. Pani Anna Czajkowska jest współautorem kilku publikacji naukowych, w tym pierwszym autorem pracy pt. „Anticancer Effect of a Novel Octahydropyrazino[2,1-a:5,4-a']diisoquinoline Derivative and Its Synergistic Action with *Nigella sativa* in Human Gastric Cancer Cells” wydanej na łamach czasopisma JCR: *BioMed Research International* (IF>2) a opartej na wynikach niniejszego doktoratu.

Tematyka badań podjętych w pracy doktorskiej pozostaje w ścisłym związku z najistotniejszymi i najtrudniejszymi zagadnieniami współczesnych nauk medycznych – leczeniem chorób nowotworowych. Przytaczanie argumentów naukowych uzasadniających celowość działań w tym kierunku wydaje się być zbyteczne, a nawet patetyczne w XXI wieku, w czasach, gdy nowotwory stanowią problem cywilizacyjny, a przeciętny obywatel jest obeznany z powagą sytuacji osób dotkniętych tym problemem, w tym z kwestią niewystarczającej skuteczności dostępnych terapii, które nierzadko niszcząc nowotwór same przyczyniają się do śmierci pacjenta. Z kolei liczne fundacje ratunku dla dotkniętych nowotworem, często młodocianych pacjentów, alarmujące multimedialnie o wsparcie finansowe indywidualnych podatników, uświadamiają znikomą dostępność i horrendalne koszty rokujących większe nadzieje terapii, podkreślając tym samym bezradność chorego zdanego na sektor zdrowia publicznego. Taki „status quo” wskazuje na potrzebę, a nawet obowiązek, prowadzenia szeroko zakrojonych badań naukowych, które niosą szansę znalezienia nowych, bezpiecznych i tańszych podejść podnoszących skuteczność onkoterapii.

Przedstawiona do oceny praca doktorska jest pomyślną próbą odpowiedzi na to kluczowe wyzwanie. Doktorantka skierowała w niej swoje zainteresowanie w stronę gruczolakoraka żołądka, reprezentowanego przez linię AGS-CRL-1739. Nawiązując do zdobyczy medycyny tradycyjnej oraz osiągnięć współczesnej chemii farmaceutycznej zaproponowała nowe, obiecujące podejście zawarte w kompilacji właściwości przeciwnowotworowych ekstraktu z czarnuszki siewnej (*Nigella sativa*)

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

mfonono@cyf-kr.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl

oraz syntetycznej pochodnej oktahydropirazy[2,1-a:5,4-a']dizochinoliny (OM-90). Założeniem pracy było nie tylko sprawdzenie pożądanej synergistycznej aktywności przeciwnowotworowej zaproponowanego układu, ale również ocena jego skuteczności w porównaniu do monoterapii poszczególnych komponentów oraz referencyjnego leku z grupy pochodnych podofilotoksyny – etopozyny, w tym również w skojarzeniu z ekstraktem *Nigella sativa*. Nie poprzestając na tym, kolejnym istotnym założeniem pracy była szeroko zakrojona analiza potencjalnych mechanizmów działania przeciwnowotworowego testowanych połączeń na poziomie komórkowym, w oparciu o wyniki 13 różnych eksperymentów z użyciem nowoczesnych technik biotechnologii i biologii molekularnej. Założeniem wieńczącym dzieło miała być, zaś, próba opracowania nowatorskiej ścieżki dostarczania leku wykorzystująca nanocząstki.

Należą się, zatem, słowa wysokiego uznania zarówno dla trafności wyboru tematu badawczego, wpisującego się w jeden z najważniejszych imperatywów współczesnej farmacji, jak i dla założonego bogatego programu eksperymentów, który umożliwia wstępną ewaluację i dogłębną analizę różnorodnych mechanizmów działań niszczących gruczolakoraka na poziomie molekularnym oraz poszukiwanie efektywnych form podania leku z wykorzystaniem innowacyjnej nanotechnologii. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że tak sformułowany projekt badawczy zrealizowany przez Doktorantkę, gwarantuje jej uzyskanie przekrojowej wiedzy i umiejętności w zakresie wstępnego skryningu w poszukiwaniu leku przeciwnowotworowego. Taka ekspertyza jest adaptowalna na szersze badania z wykorzystaniem innych linii komórek nowotworowych i różnorodnych grup połączeń chemicznych, tak pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznego, dając Doktorantce gruntowne przygotowanie do dalszego rozwoju naukowego.

Praca doktorska p. Anny Czajkowskiej jest zredagowana bardzo logicznie i przejrzysto. Charakteryzuje ją tradycyjny układ, typowy dla czasopism farmakologicznych, w którym część eksperymentalna poprzedza opis wyników i dyskusję. Całość opisów cechuje logiczny tok myślowy oraz regularny i spokojny rytm, przywołujący na myśl „Bolero” Ravela, sprzyjając tym samym koncentracji czytelnika nawet przy rozdziałach poświęconych bardziej skomplikowanym technikom badawczym.

Logiczny tok przedstawionej myśli badawczej ma swój punkt inicjalny w 33-stronicowym Wstępie, w którym Autorka w stosownej kolejności charakteryzuje czarnuszkę siewną, jej morfologię i główne składniki o znaczeniu terapeutycznym, aby następnie przejść do kwestii alkaloidów izochinolinowych w nawiązaniu do drugiego głównego obiektu swoich badań – związku OM-90. Tu bardzo ciekawie opisuje wybrane alkaloidy pochodzenia naturalnego, ich działania przeciwnowotworowe wraz z przykładami mechanizmów molekularnych, przemycając w podtekście uzasadnienie własnych badań nad mechanizmami aktywności przeciwnowotworowej, opisanych w dalszych rozdziałach tej dysertacji. Podrozdział ten uwydatnia również pewne



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

mfonono@cyf-kr.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl

mankamenty - głównie ekonomiczne, izolacji i szerszego wykorzystania terapeutycznego niektórych ważnych alkaloidów pochodzenia naturalnego, wskazując na celowość pozyskiwania ich analogów drogą syntezy chemicznej. Szczególnie interesującą lekturą jest ostatni podrozdział Wstępu zawierający bardzo obrazową charakterystykę mucyny-1, jej roli w komórkach prawidłowych i nowotworzeniu oraz jej powiązania z aktywacją szlaków komórkowych, białkiem p53 i procesem apoptozy. Podrozdział ten jest „krypto-uzasadnieniem” wyboru mechanizmów komórkowych będących przedmiotem badań własnych Doktorantki.

Cel i zakres działań przedstawia, natomiast, kolejny rozdział pt. *Cel Pracy*, który jest skonstruowany niemniej logicznie i przejrzysto, nie pozostawiając wątpliwości, jakie zadania badawcze zostały podjęte i zrealizowane w ramach doktoratu. Nie daje on natomiast jeszcze pełnego poglądu na temat rozmiarów podjętych przez Doktorantkę badań, ich poziomu naukowego, bogactwa zastosowanych technik oraz szerokich umiejętności opracowania i interpretacji uzyskanych wyników. O tym dowiedzieć się można z kolejnego rozdziału pt. *Materiały i Metody*, przedstawiającego szczegółowe procedury 15 różnych biotechnologicznych testów skriningowych, poprzedzonych hodowlą komórkową linii AGS-CRL-1739, a uwieńczonych procedurą otrzymywania nanocząstek fosfolipidowych oraz oceną wnikanania nanoemulsji do wnętrza komórek przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Wspomniany opis procedur jest napisany prostym przystępnym językiem i świadczy o pełnym zrozumieniu tematu, a także o lekkości, z jaką Doktorantka porusza się wśród nowoczesnych technik biologii molekularnej i biotechnologii, takich jak: test kolorymetryczny MTT, użycie scyntylatora w ocenie procesu biosyntezy DNA z wykorzystaniem radioaktywnej tymidyny, użycie mikroskopu konfokalnego w badaniu zmian w morfologii komórek, wykorzystanie cytometrii przepływowej do oceny indukcji apoptozy czy zmian potencjału mitochondrialnego, a także barwienie immunofluorescencyjne i bioobrazowanie komórek przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego w celu oceny wpływu badanych związków na ekspresję kaspaz, białka p53, kinazy AKT oraz kinazy ERK1/2.

Bogaty w szatę graficzną rozdział poświęcony wynikom badań oraz kolejny, pt. *Dyskusja* są dodatkowym potwierdzeniem wiedzy i umiejętności Autorki, nabytej w trakcie wykonywania doktoratu. Wyraża to m.in. zwięzła, klarowna i poprawna interpretacja uzyskanych wyników oraz ich dogłębna analiza przeprowadzona w na bazie doniesień literatury światowej, z uwzględnieniem wyników wcześniejszych prac kooperantów.

Niewątpliwym osiągnięciem przeprowadzonych badań jest niepodważalnie potwierdzony synergizm działania przeciwnowotworowego kompilacji *Nigella sativa*/OM-90, deklasujący w teście na komórkach gruczolakoraka żołądka, zarówno monoterapię z użyciem poszczególnych komponentów, jak i referencyjny etopozyd i jego analogiczne skojarzenie z ekstraktem z czarnuszki siewnej.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

mfonono@cyf-kr.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Przeprowadzone testy potwierdziły to jednomyślnie, dowodząc nie tylko najsilniejszego działania cytotoksycznego skojarzonej terapii oleju z nasion *Nigella sativa* z OM-90, ale też większej inhibicji procesu biosyntezy DNA, spadku poziomu ekspresji genu *MUC1* na poziomie mRNA, najsilniejszego wpływu na indukcję procesu apoptozy komórek nowotworowych, a także indukowania typowych dla zjawiska apoptozy zmian w morfologii komórek, pozostawiając w tyle zarówno kombinację badanego oleju z etopozydem, jak i oleju z nasion czarnuszki, etopozydu i związku OM-90 w monoterapii.

Całokształt wyników ujętych w przedstawionej do oceny dysertacji jednoznacznie dowodzi, że przedsięwzięcie badawcze, jakie podjęła Doktorantka, zakończyło się dużym sukcesem – zidentyfikowała nowe farmaceutyczne podejście w walce z rakiem, przewyższające działaniem stosowany klinicznie lek, a co za tym idzie rogujące duże nadzieje na udoskonalenie obecnej, niezadowolającej terapii nowotworowej.

Sama, zaś 143-stronicowa dysertacja, zawiera wszystkie elementy wymagane dla wzorowej pracy doktorskiej. Jest opatrzona ciekawą szatą graficzną, na którą składają się 4 tabele oraz 31 rycin, w większości zawierających kolorowe zdjęcia obrazujące wyniki prowadzonych testów. Doktorantka odwołała się do 232 doniesień literaturowych, w przewadze pochodzących z ostatnich lat. Praca zaopatrzona jest również w polsko- i angielskie streszczenie, spis treści, spis skrótów oraz dedykację i podziękowania.

Dysertacja została przygotowana niezwykle starannie i trudno doszukać się w niej jakichkolwiek uchybień merytorycznych. Z dużym wysiłkiem udało mi się znaleźć zaledwie jeden błąd literowy oraz parę następujących niedociągnięć redakcyjnych, na które Doktorantka powinna zwrócić uwagę, przetwarzając dalej wyniki doktoratu:

1. Na str.35 błąd literowy: „antygenwe” zamiast „antygenowe”
2. W zdaniu na str. 57: „Wartości uzyskane w próbach badanych, jako procent wartości kontrolnej.”” zabrakło orzeczenia
3. Rycina 19 – Doktorantka niesłusznie nazywa kwadratami 4 prostokąty klasyfikujące komórki w pomiarze cytometrycznym, spośród których jedynie prawy górny wydaje się być kwadratem.
4. Tytuły podrozdziałów Rozdziału 4 są trochę za długie. Doktorantka mogła tego uniknąć nie powielając w nich informacji zawartych w rozdziałach/podrozdziałach nadrzędnych, zwłaszcza w aspekcie badanych związków i ich kombinacji – powtarzającej się w poszczególnych etapach bogatego skriningu biologicznego.

Te bardzo nieznaczne niedostatki nie tylko nie wpływają na moją wysoce pozytywną opinię, ale, biorąc pod uwagę ich znikomą ilość, jeszcze bardziej utwierdzają mnie w przekonaniu o wysokim poziomie i staranności przeprowadzonych prac badawczych poczynając od ich racjonalnej

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

mfkonono@cyf-kr.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl

i przejrzystej koncepcji, a skończywszy na zredagowaniu wydrukowanej wersji dysertacji.

Czytając pracę nasunęło mi się następujące pytanie:

W rozdziale *Dyskusja*, Doktorantka wspomina o wcześniejszych badaniach przesiewowych dla związku OM-90. Jakie to były testy i jak wyglądała aktywność tego związku w porównaniu do tej potwierdzonej w niniejszej pracy doktorskiej, w monoterapii i terapii skojarzonej?

Chciałabym, żeby Doktorantka wypowiedziała się na ten temat w czasie obrony.

Reasumując, zarówno pod względem merytorycznym, jak i redakcyjnym i graficznym praca spełnia wszelkie wymagania stawiane doktoratom z zakresu nauk farmaceutycznych, a zawarta w niej treść świadczy o wysokim poziomie wiedzy i umiejętności p. mgr Anny Czajkowskiej, w pełni kwalifikującym ją do ubiegania się o stopień doktora nauk farmaceutycznych.

Zwracam się, zatem, do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie pani magister Anny Czajkowskiej do finalnych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę niezwykle ważne znaczenie ujętych w doktoracie badań dla rozwoju terapii chorób nowotworowych, a także mając na względzie bogaty warsztat badawczy i wysoki poziom naukowy zademonstrowanych przez Doktorantkę umiejętności skriningowych, wnioskuję o wyróżnienie przedłożonej mi do oceny pracy doktorskiej.

Kraków, 11 lipca 2019

Dr hab. Jadwiga Handzlik, prof. UJ



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

mfkonono@cyf-kr.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl