



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Kraków, 23.11.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.:
*„Mucyna 1 jako cel molekularny nowej pochodnej diizochinoliny w skojarzeniu
z przeciwciałem anty-MUC1 w komórkach raka piersi MFC-7 i raka żołądka AGS”*
wykonanej przez **mgr Wojciecha Szymanowskiego**
w Zakładzie Biotechnologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Anny Bielawskiej
i Pani dr Agnieszki Gornowicz

Przedstawiona do oceny praca Pana mgr Wojciecha Szymanowskiego reprezentuje problematykę badawczą z zakresu poszukiwania nowych skutecznych terapii przeciwnowotworowych. Najnowsze dane sugerują, że maksymalnie tylko około 75% pacjentów z chorobą nowotworową pozytywnie reaguje na klasyczne schematy leczenia. Opracowanie i stosowanie terapii celowanej, skoncentrowanej na zdefiniowanym celu molekularnym nowotworu daje znacznie większą szansę na wyleczenie, zminimalizowanie efektów toksycznych oraz zmniejszenie ryzyka powikłań. Akceptowane obecnie w leczeniu chorób nowotworowych terapie celowane wykorzystują modulatory ekspresji genów, inhibitory transdukcji sygnału, inhibitory angiogenezy, induktory apoptozy, przeciwciała monoklonalne, szczepionki przeciwnowotworowe. Występowanie nieprawidłowości w jednym lub w większej ilości szlaków molekularnych, które odpowiadają za przeżycie i namnażanie komórek nowotworowych przyczynia się do rozwoju oporności i stanowi uzasadnienie dla opracowania strategii terapeutycznych polegających na łączeniu celowanej terapii molekularnej ze standardowymi chemioterapeutykami.

Łączenie przeciwciał monoklonalnych z chemioterapeutykami stanowi jeden z przykładów strategii wykorzystywanych w terapii ukierunkowanej na konkretne cele molekularne, która prowadzi do zwiększenia aktywności przeciwnowotworowej. Stosowanie rituksimabu z cyklofosfamidem, winkrystyną i prednizonem w leczeniu chłoniaka złośliwego, trastuzumabu z doksorubicyną, cyklofosfamidem i paklitakselem w leczeniu chorych na raka

Zakład Biochemii Farmaceutycznej

ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, tel. +48 12 620 55 77, +48 12 620 55 98, faks +48 12 620 55 77

www.famacja.cm-uj.krakow.pl

piersi, czy też bewacyzumabu z 5-fluorouracylem w leczeniu pacjentów z przerzutowym rakiem jelita grubego lub odbytnicy to tylko niektóre przykłady terapii łączącej działanie przeciwciał monoklonalnych z chemioterapeutykami, które zyskały akceptację i rejestrację Amerykańskiej Agencji do Spraw Leków i Żywności.

Doktorant wpisując się w obszar badawczy związany z poszukiwaniem skutecznych rozwiązań terapeutycznych w leczeniu chorób nowotworowych, jako cel molekularny wybrał mucynę 1 (MUC1), która została uznana przez National Cancer Institute za jeden z najbardziej obiecujących w ostatnich latach. Mucyna 1 wykazuje nadmierną ekspresję w wielu nowotworach pochodzenia nabłonkowego, szczególnie raku piersi i żołądka. Jest zaangażowana we wzrost, inwazję, promowanie angiogenezy oraz chemooporność komórek nowotworowych na zaprogramowaną śmierć komórkową. Liczne wyniki badań przedklinicznych wskazują, że zastosowanie przeciwciała anty-MUC1 może uwrażliwiać komórki nowotworowe na działanie chemioterapeutyków, co daje nadzieję na ich wykorzystanie w skojarzonej terapii celowanej.

W związku z tym Doktorant w ramach pracy doktorskiej podjął się oceny aktywności biologicznej nowej pochodnej oktahydropirazyno[2,1-a:5,4-a']diizochinoliny (zw. OM-86II) w skojarzeniu z przeciwciałem monoklonalnym anty-MUC1 w modelu komórkowym raka piersi (MCF-7) i raka żołądka (AGS) oraz poznania molekularnego mechanizmu ich działania.

Uważam, że podjęta przez Autora tematyka badań oraz postawione zadania i cele są jak najbardziej aktualne i uzasadnione, a otrzymane rezultaty posiadają duże walory zarówno poznawcze, jak i aplikacyjne.

Praca zawiera 170 stron maszynopisu w typowym układzie: Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bogate piśmiennictwo liczące 271 pozycji bibliograficznych.

Wstęp został zredagowany w jasny i syntetyczny sposób. Na 34 stronach Doktorant zawarł istotne aktualne informacje dotyczące budowy oraz biologicznej roli mucyn. Szczególnie wiele uwagi w tym rozdziale poświęcił udziałowi mucyny 1 w kancerogenezie i progresji nowotworów, a także różnym możliwościom opracowywania terapii ukierunkowanych na mucynę 1 (inhibitory drobnocząsteczkowe, przeciwciała monoklonalne, aptamery, szczepionki, alkaloidy izochinolinowe).

Cel oraz zakres zaplanowanych badań został przez Doktoranta przedstawiony logicznie i klarownie, a dobór testów biochemicznych, immunoenzymatycznych, metod analitycznych

oraz statystycznych jest jak najbardziej właściwy i adekwatny w stosunku do wytyczonych zadań badawczych.

Doktorant w pierwszej kolejności ocenił aktywność cytotoksyczną etopozyny (związek referencyjny), nowej pochodnej diizochinoliny OM-86II (związek zsyntetyzowany w Instytucie Chemii Organicznej PAN w Warszawie) oraz przeciwciała monoklonalnego anti-MUC1-GP1.4 metodą Carmichael'a przy użyciu soli tetrazolowej (test MTT) względem komórek raka piersi MCF-7 oraz komórek raka żołądka AGS. Następnie zbadał ich właściwości antyproliferacyjne szacując hamowanie biosyntezy DNA, opierając się na pomiarze wbudowywania znakowanej radioaktywnie tymidyny do DNA badanych komórek. Otrzymane rezultaty wskazały na wysoki potencjał cytotoksyczny i wysoką aktywność antyproliferacyjną nowej pochodnej diizochinoliny (OM-86II) zastosowanej w skojarzeniu z przeciwciałem anti-MUC1 względem badanych linii komórkowych, co mogło być wynikiem wpływu tych substancji na aktywowaną programowaną śmierć komórek. W związku z tym w dalszej kolejności Doktorant przeprowadził badania, których celem było określenie właściwości proapoptotycznych badanych substancji i ich kombinacji.

Indukcję apoptozy ocenił stosując metodę z aneksyną V i jodkiem propidyny wykorzystując technikę cytometryczną oraz mikroskopu fluorescencyjnego. Następnie ustalił wpływ testowanych substancji po ich oddzielnym oraz skojarzonym zastosowaniu na mitochondrialny potencjał błonowy, ekspresję białka p53 oraz wpływ na stężenie wybranych białek przekąźnictwa sygnałowego: Bax, kinazy mTOR, sICAM, MMP-2, oraz MMP-9.

Wyniki badań Doktorant opisał na str. 71-125. Rezultaty jednoznacznie wykazały, że nowa pochodna diizochinoliny, OM-86II zastosowana łącznie z przeciwciałem anti-MUC1 wykazuje silniejsze właściwości cytotoksyczne i antyproliferacyjne w porównaniu do skojarzonego działania etopozyny z przeciwciałem anti-MUC1 w komórkach raka piersi linii MCF-7 oraz raka żołądka linii AGS. Ponadto kombinacja OM-86II z przeciwciałem anti-MUC1 posiada silniejsze działanie proapoptotyczne, a zainicjowana przez nią apoptoza przebiega szlakiem wewnątrzpochodnym i związana jest ze wzrostem ekspresji białka p53 oraz stężenia białka Bax. Przeciwciało anti-MUC1 w skojarzeniu z OM-86II przyczynia się do obniżenia stężenia białek odpowiedzialnych za zwiększoną proliferację i inwazję komórek nowotworowych, takich jak: mTOR, sICAM-1, MMP-2 i MMP-9 w komórkach raka piersi MCF-7, natomiast w komórkach raka żołądka powoduje obniżenie stężenia białek mTOR, sICAM-1 i MMP-9 oraz wzrost stężenia MMP-2. Tak, więc badania potwierdziły, że mucyna1 jest atrakcyjnym celem molekularnym w nowotworach wykazujących nadekspresję tej

glikoproteiny, a zastosowanie OM-86II w skojarzeniu z przeciwciałem monoklonalnym anty-MUC1 może stanowić cenną ukierunkowaną przeciwnowotworową strategią terapeutyczną.

Znakomitą większość wyników Autor przedstawił w postaci bardzo przejrzystych rycin (26), które wyczerpująco dokumentują przeprowadzone analizy. Większość otrzymanych danych została poddana ocenie statystycznej, co w znacznym stopniu obiektywizuje otrzymane wyniki.

Uzyskane rezultaty zostały przeanalizowane w ramach wnikliwej dyskusji (str. 126-140), w której daje się zaobserwować dużą erudycję Doktoranta i Jego umiejętność samodzielnej, krytycznej oceny własnych wyników w konfrontacji z wynikami publikowanymi przez innych autorów. Całość dyskusji świadczy o bardzo dobrym, merytorycznym przygotowaniu Doktoranta, który wykazał się umiejętnością korzystania z najistotniejszych i aktualnych danych literatury fachowej i zdolnością formułowania logicznych wniosków.

Praca została napisana poprawnym językiem naukowym, ma bardzo staranną szatę graficzną. Podczas wnikliwego czytania pracy nasunęło mi się kilka pytań, na które proszę Doktoranta o odpowiedź:

1. Chętnie dowiedziałabym się na jakiej podstawie została wytypowana do badań pochodna diizochinoliny OM-86II, czy wynikało to np. z wcześniej przeprowadzonych testów przesiewowych? Jeśli tak, to jakich?
2. Czy oznaczono cytotoksyczność związku OM-86II względem komórek linii prawidłowych? Czy istnieje taka konieczność? – proszę o komentarz.
3. W mojej opinii posługiwanie się terminem „monoterapia” w kontekście badań komórkowych *in vitro* jest dość dyskusyjne – proszę o przedstawienie alternatywnych propozycji.

Wymienione drobne niedoskonałości i wagi w żadnym razie nie umniejszają wartości merytorycznej pracy.

Podsumowując pragnę stwierdzić, Pan mgr Wojciech Szymanowski przedłożył bardzo wartościową pracę, którą oceniał bardzo wysoko, wnosi poważny wkład w opracowywanie strategii celowanej terapii przeciwnowotworowej. Doktorant wykazał się umiejętnością tworzenia hipotezy badawczej, projektowania i przeprowadzenia eksperymentów z szeroko rozumianej chemii medycznej, farmakologii i biologii komórki. Wykazał wysokie kompetencje w zakresie analizy otrzymanych wyników oraz formułowania wniosków.

W mojej opinii recenzowana rozprawa w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim określone w Art. 13 ust. 1 z dn. 14 marca 2003r o stopniach i tytule naukowym z późniejszymi poprawkami z 2014r. (Dz.U. Poz. 1852), dlatego zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pana mgr Wojciecha Szymanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoki poziom recenzowanej pracy, oryginalność stosowanych metod badawczych, szczególne walory poznawcze i aplikacyjne oraz fakt, że część badań została opublikowana w czasopiśmie anglojęzycznym o zasięgu międzynarodowym (IF=3,906; 70 pkt MNiSW) zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana Wojciecha Szymanowskiego.

prof. dr hab. Elżbieta Pękała