

Katowice, 8.12.2021 r

Ocena pracy doktorskiej pt.:

***Molekularny mechanizm przeciwnowotworowego
działania wybranych niesteroidowych leków
przeciwzapalnych jako agonistów receptora PPAR γ
w eksperymentalnym modelu raka piersi***

wykonanej przez

mgr Adama Kazberuka

w Zakładzie Chemii Leków

Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

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

KIEROWNIK KATEDRY
Prof. dr hab. n. farm.
Dorota Wrześniak
tel.: (+48 32) 364 16 11

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

Rak piersi to nowotwór złośliwy o typie zaburzenia proliferacyjnego w obrębie gruczołu sutkowego, który rozwija się miejscowo w piersi oraz daje przerzuty do węzłów chłonnych i narządów wewnętrznych (np. płuc, wątroby, kości i mózgu). Rak piersi jest problemem zdrowotnym, wymagającym pilnych działań, zarówno w krajach wysoko rozwiniętych jak i rozwijających się. Pod koniec 2020 r. oszacowano, że liczba kobiet, u których zdiagnozowano nowotwór piersi w ciągu ostatnich 5 lat wynosiła 7,8 miliona. Tym samym, rak piersi uznano za najbardziej rozpowszechniony typ nowotworu na świecie. Jest on również zaliczany do najczęstszych przyczyn zgonów wśród pacjentów onkologicznych (685 000 zgonów w 2020 r.).

Pandemia zakaźnej choroby COVID-19 wywołanej przez koronawirusa SARS-CoV-2 wpłynęła negatywnie na programy zwalczania raka piersi, np. poprzez redukcję wykonywanych badań mammograficznych (przesiewowych i diagnostycznych). Zaobserwowano również niekorzystne modyfikacje w zakresie terapii, w tym opóźnienia i ograniczenia podawania chemioterapii pacjentkom z rakiem piersi.



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Opóźniona diagnostyka i leczenie mogą w najbliższych latach skutkować wzrostem liczby pacjentek w zaawansowanym stadium choroby i ostatecznie zwiększoną śmiertelnością. Poszukiwanie nowych możliwości leczenia złośliwych nowotworów piersi stanowi pilne wyzwanie dla współczesnej nauki, w związku z tym problem podejmowany w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej uważam za uzasadniony, istotny zarówno z punktu naukowego jak i znaczenia medycznego.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Adama Kazberuka stanowi oryginalne opracowanie dotyczące repozycjonowania leków o scharakteryzowanym profilu toksykologicznym, w aspekcie poszukiwania nowych możliwości terapeutycznych w przebiegu złośliwych nowotworów piersi. Doktorant wykorzystał doświadczenie własne, bardzo dobrego zespołu badawczego w którym pracował, co stanowi gwarancję rzetelności i poprawności uzyskanych wyników badań.

Tytuł dysertacji Doktoranta został prawidłowo sformułowany i w pełni odzwierciedla cel badań. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana magistra farmacji Adama Kazberuka obejmuje 125 stron tekstu wraz z piśmiennictwem. Tekst pracy podzielony jest na typowe dla opracowań naukowych rozdziały, z zachowaniem właściwych pomiędzy nimi proporcji. Dodatkowo w pracy zamieszczono wykaz skrótów stosowanych w tekście pracy, znacząco ułatwiający jej lekturę oraz spis rycin i tabel.

Omówione we Wstępie zagadnienia świadczą o dużej wiedzy i starannym przygotowaniu Pana Magistra do podjęcia badań, będących podstawą Jego pracy doktorskiej, a także stanowią dobre wprowadzenie do postawionego celu badań.

Celem naukowym przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej była ocena wpływu wybranych NLPZ jako agonistów receptora PPAR gamma na indukcję zależnej od aktywności PRODH/POX apoptozy w komórkach raka piersi linii MCF7. Założony cel badań Doktorant postanowił zrealizować poprzez: i/ analizę wpływu wybranych NLPZ na homeostazę komórek raka piersi linii MCF7, w tym między innymi procesy apoptozy i autofagii, ii/ zaprojektowanie nowego modelu badawczego komórek MCF7 ze znokautowanym genem PRODH/POX oraz iii/ ocenę wpływu wybranych NLPZ na procesy zachodzące w opracowanym nowym modelu komórkowym.

Szczegółowy opis imponującego zakresu zastosowanych technik i metod badawczych, wraz z wykazem odczynników chemicznych Doktorant zamieścił w rozdziale Materiały i metody. Przedstawione metody są co do zasady aktualne i adekwatne do rozwiązywanych problemów naukowych i nie budzą żadnych wątpliwości. Pojawiło się jednak kilka

zagadnień, które w mojej opinii są interesujące z praktycznego punktu widzenia i dlatego proszę o ich doprecyzowanie:

i/ proszę uzasadnić dobór stężeń leków z grupy NLPZ zastosowanych w badaniach - w pracy zastosowano: *0,75mM ibuprofen, 0,5mM indometacynę, 0,375mM diklofenak, 0,06mM sulindak, 0,02mM celekoksyb oraz 0,02 mM troglitazon* – w pracy na str. 60 jest zamieszczona informacja (*„Komórki były inkubowane przez 24 godziny z NLPZ o udokumentowanym powinowactwie do receptorów PPARγ, w stężeniach dobranych doświadczalnie oraz potwierdzonych w literaturze”*), którą warto doprecyzować;

ii/ proszę uzasadnić dobór czasu inkubacji komórek z badanymi lekami w poszczególnych testach (*np. 18 h inkubacji dla testu z aneksyną V, 4 h dla testu z sondą DCFDA, większość testów: 24-godzinna inkubacja*);

iii/ proszę wyjaśnić dlaczego ekspresję PPAR gamma zbadano przy użyciu mikroskopii (ryc. 16), a ekspresję PPAR delta techniką Western blot (ryc. 17)? Ekspresja PRODH/POX była oznaczana za pomocą dwóch technik (ryc. 18 i 19).

Powyższe pytania nie mają charakteru uwag krytycznych, mogą natomiast stanowić inspirację do dyskusji.

Podsumowując eksperymentalną część przeprowadzonych badań należy podkreślić, iż przedstawione w prezentowanej rozprawie doktorskiej wyniki potwierdzają hipotezę o przeciwnowotworowych właściwości NLPZ niezależnych od COX-2. Wykazano, że NLPZ jako agoniści receptora PPAR gamma, w wyniku aktywacji zależnego od PRODH/POX stresu oksydacyjnego wywołują apoptozę w komórkach raka piersi MCF7. Istotnym osiągnięciem Autora rozprawy doktorskiej było opracowanie innowacyjnego modelu raka piersi MCF7, z całkowicie wyciszoną ekspresją PRODH/POX dzięki zastosowaniu metody CRISPR/Cas9. Na uwagę zasługuje fakt, iż dotychczas nie opublikowano badań naukowych, które wykorzystywałyby tego typu model eksperymentalny do oceny funkcji PRODH/POX w metabolizmie komórkowym. Równie interesującym odkryciem przedstawionym w rozprawie było wykazanie, że w komórkach ze znokautowanym genem PRODH/POX, NLPZ indukują apoptozę szlakiem zewnątrzpo pochodnym, z kolei w komórkach wykazujących ekspresję PRODH/POX, NLPZ indukują apoptozę szlakiem wewnątrzpo pochodnym.

Przeprowadzone badania pozwoliły Autorowi na sformułowanie w pełni uzasadnionych wniosków, korespondujących z założonym celem pracy. Niezaprzeczalnym sukcesem Autora jest realizacja zadań badawczych których wyniki sugerują, że PRODH/POX może stanowić potencjalny punkt uchwytu eksperymentalnej farmakoterapii raka piersi.

Rozprawa doktorska została zakończona streszczeniem w języku polskim i angielskim.

Cytowane przez Doktoranta 159 pozycji Piśmiennictwa naukowego odzwierciedla aktualny stan wiedzy w obrębie omawianego problemu. Piśmiennictwo zostało właściwie dobrane oraz poprawnie cytowane. Autor posługuje się fachowym słownictwem, co świadczy o dobrej orientacji w badanej dziedzinie. Z dużą satysfakcją pragnę też podkreślić, że treść pracy napisana jest starannie, zwarcie i utrzymana w logicznej sekwencji. Styl sformułowań jest poprawny naukowo, a tekst komunikatywny.

Z obowiązku recenzenta wspomnę, że Autorowi przydarzyły się drobne pomyłki edytorskie, jak również nie znalazłam informacji w ilu powtórzeniach wykonano eksperymenty, co nie wpływa na jakość badań, prezentowanych wyników i wartość merytoryczną ocenianej pracy.

Równocześnie, wartym podkreślenia atutem jest uzyskanie finansowania badań będących przedmiotem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej, w ramach realizacji grantu PRELUDIUM Narodowego Centrum Nauki (nr: 2017/27/N/NZ7/02370) pt. *„Molekularny mechanizm przeciwnowotworowego działania wybranych NLPZ jako agonistów receptora PPAR gamma w eksperymentalnym modelu raka piersi”*, którego Doktorant był kierownikiem. W tym miejscu chciałabym zapytać, czy wyniki prezentowane w rozprawie zostały już opracowane w formie manuskryptu/ów?

Reasumując, przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Adama Kazberuka włącza się w niezwykle istotny zarówno z punktu widzenia naukowego jak i medycznego, nurt badań poświęconych poszukiwaniu potencjalnych rozwiązań terapeutycznych w przebiegu raka piersi. Tło naukowo-farmakologiczno-medyczne omawianych zagadnień zostało przedstawione wyczerpująco, w oparciu o adekwatne i aktualne opracowania naukowe. Uzyskane przez Doktoranta wyniki są oryginalne i zaprezentowane w rzetelny sposób.

Wobec powyższego, pracę pt. *„Molekularny mechanizm przeciwnowotworowego działania wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych jako agonistów receptora PPARγ w eksperymentalnym modelu raka piersi”* uważam za odpowiadającą wymogom stawianym rozprawom na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne i z pełnym przekonaniem wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, o jej przyjęcie i dopuszczenie Pana mgr Adama Kazberuka, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii i Analiz Leków
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
hwrześniak Dacie
prof. dr hab. n. farm. Dorota Wrześniak