



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

ul. Rokietnicka 3
60-806 Poznań

tel.: 61 641 83 38
aklupczynska@ump.edu.pl

Dr hab. Agnieszka Klupczyńska-Gabryszak

Poznań, 27.06.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Pawła Łukasza Szoki

**pt. „Mechanizm pro-apoptotycznego działania cholekalcytriolu i menandionu
w komórkach melanomy”**

Choroby nowotworowe stanowią narastający i poważny problem zdrowotny, społeczny i ekonomiczny w Polsce i na świecie. Liczba pacjentów onkologicznych rośnie, a prognozy demograficzne wskazują, że od 2025 roku nowotwory złośliwe staną się główną przyczyną zgonów w Polsce. Dlatego też choroby nowotworowe stanowią jedno z największych wyzwań współczesnych nauk medycznych i farmaceutycznych. Przedstawiona praca doktorska koncentruje się na przeciwnowotworowym działaniu witamin D₃ oraz K₃. Zaproponowaną tematykę badawczą uważam za uzasadnioną i ważną. Podjęte przez Doktoranta badania wnoszą wkład w poznanie mechanizmu indukcji apoptozy przez te witaminy, a ich kontynuacja może doprowadzić do opracowania nowych metod leczenia nowotworów złośliwych, a także skutecznych metod obniżenia ryzyka wystąpienia nowotworów.

Przedstawiona dysertacja została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Wojciecha Mityka (promotora) z Zakładu Analizy i Bioanalizy Leków Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku oraz dr hab. Ilony Ościłowskiej (promotora pomocniczego) z Zakładu Chemii Leków Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, w zespole badaczy o dużym doświadczeniu w prowadzeniu badań z zakresu wyjaśniania mechanizmów komórkowych, zwłaszcza związanych z metabolizmem proliny. Układ pracy jest prawidłowy. Przedstawiona rozprawa liczy 85 stron i rozpoczyna się od spisu treści oraz wykazu stosowanych skrótów. Praca zawiera dobrze rozwinięty wstęp teoretyczny, jasno opisaną część doświadczalną, omówienie wyników oraz dyskusję. Końcowymi elementami pracy są wnioski, wykaz rycin i tabel, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bibliografia składająca się z 183 pozycji.

We wstępie Doktorant zawarł wprowadzenie do poruszanej tematyki badawczej, opisując charakterystykę czerniaka skóry, działanie witamin D oraz K, a także procesy apoptozy i autofagii, akcentując rolę dehydrogenazy prolinowej/oksydazy prolinowej w tych procesach. Autor dysertacji zwrócił uwagę na synergistyczne działanie witamin D i K w regulacji procesów metabolicznych. Obiektem jego zainteresowania naukowego stał się synergizm działania przeciwnowotworowego tych dwóch witamin. Doktorant sformułował hipotezę, że mechanizm działania przeciwnowotworowego witamin D₃ (cholekalcytriolu) i K₃ (menadionu) może zachodzić poprzez pobudzenie ekspresji dehydrogenazy prolinowej/oksydazy prolinowej (PRODH/POX), generującej reaktywne formy tlenu i prowadzącej do apoptozy szlakiem mitochondrialnym.

Celem badań przeprowadzonych przez Doktoranta była ocena mechanizmu działania pro-apoptotycznego witaminy D₃ (cholekalcytriolu) oraz witaminy K₃ (menadionu). Badania przeprowadzono z wykorzystaniem komórek melanomy i fibroblastów skóry ludzkiej, które stanowiły komórki referencyjne nie wykazujące ekspresji dehydrogenazy prolinowej/oksydazy prolinowej (PRODH/POX). Cel pracy został jasno zdefiniowany i konsekwentnie realizowany podczas kolejnych etapów prac doświadczalnych, obejmujących badanie wpływu witamin D₃ i K₃ na następujące procesy: przeżywalność komórek, integralność błon komórkowych, biosyntezę DNA, ekspresję wybranych markerów apoptozy i autofagii, biosyntezę kolagenu, aktywność prolidazy, ekspresję dehydrogenazy prolinowej/oksydazy prolinowej, produkcję reaktywnych form tlenu. Uzupełnieniem danych zebranych podczas wyżej wymienionych badań był ponadto pomiar wewnątrzkomórkowego stężenia proliny. Doktorant podjął się zatem realizacji postawionego celu badawczego w sposób kompleksowy, umożliwiający dogłębną i wszechstronną ocenę wpływu witamin D₃ i K₃ na molekularne mechanizmy związane z indukcją apoptozy i roli enzymu PRODH/POX w tych procesach.

W ramach badań przeprowadzonych przy realizacji pracy doktorskiej Autor dysertacji zastosował kilka różnych metod i technik z zakresu chemii analitycznej i biologii molekularnej, m.in. spektrofotometrię absorpcyjną w zakresie światła widzialnego, fluorymetrię, chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas oraz Western blot.

W pierwszym etapie podjętych prac badawczych Doktorant wykazał, że witamina D₃ oraz witamina K₃ spowodowały obniżenie przeżywalności komórek czerniaka do około 50% wartości kontrolnej. Ponadto kolejne eksperymenty pokazały znaczące obniżenie integralności błon komórkowych komórek czerniaka w stosunku do komórek kontrolnych,

przy braku wpływu na integralność błon komórkowych fibroblastów. Potwierdzeniem cytotoksycznego działania witamin D_3 i K_3 w komórkach czerniaka była ocena wpływu tych witamin na biosyntezę DNA i wykazanie istotnie statystycznego obniżenia biosyntezy DNA komórek czerniaka, odpowiednio do około 70% i 80%, w stosunku do komórek kontrolnych. W kolejnym etapie prac Doktorant przeprowadził badanie wpływu witaminy D_3 i witaminy K_3 na ekspresję pięciu wybranych markerów apoptozy i autofagii. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono zwiększenie ekspresji aktywnej formy kaspazy-3 w wyniku działania witamin D_3 i K_3 , zarówno w komórkach czerniaka cechujących się wysoką ekspresją tego białka, jak i w komórkach fibroblastów charakteryzujących się niewielką ekspresją tego białka. Ponadto wykazano, że jedynie witamina D_3 pobudza ekspresję aktywnej formy kaspazy-9 oraz aktywnej formy PARP w komórkach czerniaka. Dodatkowa analiza ekspresji wybranych markerów autofagii wykazała silne pobudzenie ekspresji bekliny-1 w komórkach czerniaka przez obie badane witaminy oraz brak wpływu testowanych witamin na ekspresję białka Atg7. Szczególnie interesującym uzupełnieniem powyższych wyników badań było wykonanie w następnym etapie prac oceny wpływu witamin D_3 i K_3 na biosyntezę kolagenu, aktywność prolidazy oraz wewnątrzkomórkowe stężenie proliny. Autor dysertacji wykazał zmniejszenie syntezy kolagenu w testowanych komórkach w obecności witaminy D_3 , a także znaczący spadek aktywności prolidazy w komórkach czerniaka w obecności witaminy D_3 , któremu towarzyszył wzrost zawartości wolnej proliny w komórce, wzrost ekspresji dehydrogenazy prolinowej/oksydazy prolinowej oraz wzrost ilości reaktywnych form tlenu w komórkach czerniaka. Uzyskane wyniki zostały następnie omówione w postaci pięciostronicowej dyskusji, świadczącej o dobrej znajomości literatury przedmiotu oraz umiejętności krytycznej oceny uzyskanych danych przez Doktoranta.

W końcowej części rozprawy doktorskiej Doktorant zawarł 7 wniosków, świadczących o tym, że cel rozprawy został osiągnięty. Chciałabym zwrócić uwagę Doktoranta na kwestię ostrożnego formułowania wniosków. Do tego aspektu odniosę się w dalszej części recenzji.

Pod względem formalnym praca została przygotowana bardzo starannie i napisana poprawnym językiem naukowym. Wyniki badań zostały przedstawione w postaci czytelnych rycin, co ułatwia ich interpretację. Użyteczny jest także schemat ilustrujący proponowany mechanizm proapoptotycznego działania witamin D_3 i K_3 towarzyszący wnioskowi płynącemu z dysertacji.

Wywiązując się z obowiązku recenzenta, chciałabym przedstawić kilka uwag oraz zagadnień do dyskusji i proszę o ustosunkowanie się do nich w trakcie publicznej obrony:

- 1) W wykazie skrótów warto byłoby podać angielskie nazwy poszczególnych pojęć, które pokazałyby pochodzenie danego akronimu. Angielskie nazwy zostały podane przez doktoranta w tekście głównym rozprawy zazwyczaj przy pierwszym użyciu danego skrótowca, jednak nie dla wszystkich użytych skrótowców.
- 2) Doktorant we wprowadzeniu teoretycznym opisuje charakterystykę i występowanie witaminy K, podając wzory strukturalne witaminy K₁ (filochinonu) oraz witaminy K₂ (menachinonu). W mojej opinii brakuje umieszczenia w tej części rozprawy wzoru witaminy K₃ (menadionu), zwłaszcza, że przeprowadzone badania obejmowały ocenę wpływu tego rodzaju witaminy K na proces apoptozy w komórkach melanomy.
- 3) Ryciny 1, 2, 3, 4 nie posiadają podanego źródła lub informacji o tym za pomocą jakiego programu zostały stworzone przez Doktoranta. Proszę o uzupełnienie tej informacji.
- 4) Na stronie 15 Autor dysertacji podaje, że zalecane dzienne spożycie witaminy D wynosi 400-1000 jednostek, podczas gdy na stronie 23 pojawia się wartość 1000-2000 jednostek. Z związku z tym, że zapotrzebowanie na witaminę D zależy od wieku, masy ciała, ekspozycji na promieniowanie słoneczne, nawyków żywieniowych w literaturze podawane są różne wartości zalecanych dobowych dawek witaminy D. Proszę o rozwinięcie tego tematu i wyjaśnienie źródła różnicy znalezionej w pracy.
- 5) Rodzaj testowanej witaminy D i K powinien być doprecyzowywany za każdym razem w pracy. Informacji o tym, że badania obejmowały wpływ witaminy D₃ oraz K₃ brakuje chociażby w podrozdziale 3.10 oraz 3.11, a także na rycinie 30. Ponadto, biorąc po uwagę umożliwienie odtworzenia opisanych eksperymentów przez inne grupy badawcze, brakuje w mojej ocenie informacji o źródle i postaci stosowanych wzorców witamin D₃ i K₃ oraz o sposobie przygotowania ich roztworów.
- 6) Doktorant we wniosku nr 6 stwierdził, że witamina D₃ i K₃, jak również łączne stosowanie tych witamin statystycznie znamienne obniżają biosyntezę kolagenu w komórkach czerniaka, jak i fibroblastach, podczas gdy w wynikach opisanych w podrozdziale 4.6 podane jest, że witamina K₃ inkubowana z komórkami czerniaka pozostawała bez wpływu na ten proces. Proszę o wyjaśnienie tej nieścisłości.

- 7) W związku z uwagą powyżej, dla uściślenia zaobserwowanych różnic w działaniu witamin D₃ i K₃ sugerowałabym stworzenie podsumowania wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach, np. w formie tabelarycznej. Łatwiej byłoby ocenić zaobserwowane różnice we wpływie witamin D₃ i K₃ na badane procesy komórkowe, gdyby były one w sposób jasny wypunktowane.
- 8) W pracy nie uniknięto drobnych błędów edytorskich, literówek (str. 14, 15, 17, 39, 44), ponadto nazwy angielskie („adenosine monophosphate-activated protein”, str. 8) i łacińskie („in vitro”, str. 8 i 22) nie zawsze zostały napisane kursywą.

Pragnę zaznaczyć, że moje powyższe uwagi, komentarze i zapytania nie obniżają wartości merytorycznej ocenianej rozprawy.

Podsumowując, przedłożona przez pana mgr Pawła Łukasza Szokę praca doktorska stanowi rzetelny i wartościowy opis badań wpływu witamin D₃ i K₃, stosowanych oddzielnie oraz w połączeniu, na proces apoptozy w komórkach melanomy i fibroblastach skóry ludzkiej. Praca została dobrze zaprojektowana i wykonana. Uzyskane wyniki posiadają wyraźne elementy oryginalności naukowej i stanowią cenne źródło informacji dotyczących mechanizmu przeciwnowotworowego działania witamin D₃ i K₃. Badania zawarte w dysertacji posiadają nie tylko wartość poznawczą, ale także potencjał aplikacyjny i mogą być użyteczne w projektowaniu nowych strategii terapeutycznych, a także profilaktycznych zapobiegających rozwojowi czerniaka.

Biorąc pod uwagę powyższe, przedłożoną dysertację doktorską oceniam pozytywnie. Stwierdzam, że spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie pana mgr Pawła Łukasza Szoki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Agnieszka Kuczyńska - Gabryńska