

UNIwersytet MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Katedra Biofarmacji

85-089 Bydgoszcz, ul. dr. A. Jurasza 2, tel. (+48 52) 585-3900; fax: (+48 52) 585-3804

e-mail: *adam.bucinski@cm.umk.pl*

Bydgoszcz, dnia 16 maja 2022 roku

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr. farm. Karola Rólkowskiego

pt.: *Wpływ metforminy na proces POX-zależnej apoptozy/autofagii w komórkach czerniaka 32* wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Jerzego Pałki (promotor) oraz dr Ilony Ościłowskiej (promotor pomocniczy) w Zakładzie Chemii Leków na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Czerniak to nowotwór złośliwy atakujący skórę, błony śluzowe i błony naczyniowe gałki ocznej. W Polsce dochodzi do około 3100 zachorowań rocznie. Ten nowotwór charakteryzuje się bardzo wysoką dynamiką wzrostu zachorowalności, w ciągu ostatnich 30 lat liczba ta uległa potrojeniu. Niestety, etiopatogeneza tej choroby nie została w pełni poznana i brak jest skutecznej farmakoterapii. Szybka interwencja chirurgiczna jest obecnie jedyną skuteczną metodą leczenia. Niestety, zbyt często się zdarza, że pacjent trafia do lekarza w późniejszym stadium rozwoju choroby i na skuteczne leczenie chirurgiczne jest już za późno. Dlatego też w wielu ośrodkach badawczych na świecie trwają badania nad farmakoterapią tej groźnej choroby. W ostatnim okresie w piśmiennictwie specjalistycznym pojawiły się doniesienia o hamującym wpływie metforminy na rozwój tego nowotworu i właśnie tej ważnej, aktualnej tematyki dotyczy rozprawa doktorska mgr. farm. Karola Rólkowskiego. Z dużym więc zaciekawieniem sięgnąłem po przesłany do oceny wydruk rozprawy.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma układ pracy eksperymentalnej. Właściwą część rozprawy, obejmującą 104 ponumerowane strony, rozpoczyna strona tytułowa oraz podziękowania Doktoranta. Na dalszych dwóch stronach umieszczono *Spis treści*, kolejna karta stanowi informację o *Źródle finansowania*, a następnie przedstawiono czterostronicowy *Wykaz stosowanych skrótów*, które występują w pracy.

Kolejne strony tekstu przeznaczono na *Wstęp* zapoznający czytelnika z tematyką, której dotyczy rozprawa. Zaprezentowano w nim istotne informacje na temat epidemiologii i charakterystyki czerniaka oraz ważne dane odnoszące się do metforminy. Znaczny fragment tej części rozprawy został poświęcony kinazie AMP (AMPK) i jej roli w mechanizmie działania przeciwnowotworowego, roli dehydrogenazy prolinowej/oksydazy prolinowej (PRODH/POX) w procesie autofagii i apoptozy oraz charakterystyce wspomnianych procesów. Część teoretyczna została napisana ładnym i przystępnym w odbiorze językiem, pozwalając również osobie, która na co dzień nie zajmuje się tą specjalistyczną tematyką, na dobre wprowadzenie w zagadnienia, którym poświęcona jest rozprawa. Ta część pracy została wsparta właściwie dobranym i wykorzystanym w tekście piśmiennictwem specjalistycznym, co jednoznacznie świadczy o dokładnym rozeznaniu tematyki badawczej, którą zajmował się Doktorant w swojej pracy.

Na kolejnej stronie tekstu przedstawiono *Cel pracy*, który zakładał: ocenę wpływu metforminy na przeżywalność komórek oraz biosyntezę DNA w komórkach czerniaka (C32) i w fibroblastach skóry ludzkiej (CRL), a także analizę cyklu komórkowego ocenianych linii komórkowych inkubowanych w obecności określonych stężeń metforminy, ocenę ekspresji dehydrogenazy prolinowej/oksydazy prolinowej (PRODH/POX) i kinazy AMP (AMPK) w komórkach C32 oraz w fibroblastach inkubowanych w określonych stężeniach metforminy, jak i ocenę ekspresji niektórych białkowych markerów autofagii i apoptozy w badanych liniach komórkowych. Ponadto, Doktorant zaplanował analizę wpływu metforminy na całkowitą biosyntezę białka i biosyntezę kolagenu, aktywność prolidazy i analizę zawartości wolnej proliny w komórkach czerniaka oraz fibroblastów skóry ludzkiej w obecności określonych stężeń metforminy. Ostatnim punktem tej części pracy jest analiza statystyczna uzyskanych wyników.

Cel pracy został poprawnie zdefiniowany i przedstawiony w sposób jasny. By cel ten zrealizować Doktorant musiał zaplanować i wykonać wiele specjalistycznych i pracochłonnych pomiarów. Z dużym więc zainteresowaniem zapoznałem się z dalszymi stronami tekstu, przechodząc do kolejnej części dysertacji, zatytułowanej *Metody*.

Odnajdziemy tam opis przygotowania hodowli komórkowych oraz informacje o stosowanych metodach wraz z opisem warunków pomiarów oraz informacje

odnoszące się do wykonanej analizy statystycznej. Do analizy tej odniosę się jeszcze w dalszej części opinii. Należy zaznaczyć, że metody i warunki pomiarów są odpowiednio dobrane i nawiązują do celu pracy.

Wyniki to kolejny obszerny fragment tekstu, w którym na 32 rycinach mgr Karol Rólkowski przedstawił efekty przeprowadzonych eksperymentów, które umiejętnie opisał. Sposób ich prezentacji jest przejrzysty i logiczny, co ułatwia całościową analizę tekstu. W kolejnej części rozprawy przedstawiona jest *Dyskusja* wyników, którą Doktorant podparł starannie dobranym piśmiennictwem. Można tu dostrzec umiejętności mgr. Karola Rólkowskiego do krytycznej i wyważonej oceny szerokiego zakresu wykonanych badań oraz uzyskanych danych. Sposób przedstawienia dyskusji nie budzi wątpliwości co do dobrego przygotowania Doktoranta i Jego predyspozycji do pracy naukowej, w tym do trafnego wyciągania wniosków, które przedstawił w siedmiu punktach na kolejnej stronie, w części zatytułowanej *Wnioski*.

Konkluzje tam wysunięte są uzasadnione i mają odzwierciedlenie w przeprowadzonych eksperymentach. Wykonane badania wykazały, że metformina obniża przeżywalność błon komórkowych czerniaka i fibroblastów, jednak silniejsze oddziaływanie obserwowane jest w komórkach nowotworowych. Wpływa również hamująco na biosyntezę DNA, zarówno w komórkach C32 jak i fibroblastów. Metformina w komórkach czerniaka powoduje wzrost ilości komórek w fazie sub-G1 i jednocześnie zmniejsza ilość komórek w fazie G1. W przypadku komórek fibroblastów sytuacja przedstawia się odwrotnie. Doktorant zaobserwował również, że pod wpływem metforminy w komórkach czerniaka nasila się ekspresja białek apoptotycznych (aktywna forma kaspazy-9, kaspazy-3 oraz PARP) oraz autofagowych (Belkina-1 i Atg7), natomiast zjawiska tego w przypadku fibroblastów nie zaobserwował. Przeprowadzone badania wykazały, że pro-apoptotyczne działanie metforminy zachodzi przy udziale AMPK i PRODH/POX (metformina nasila ich ekspresję). Efekt ten został zauważony w obydwu liniach komórkowych, jednak silniejszy efekt zaobserwowano w komórkach nowotworowych. Doktorant wykazał również, że metformina indukuje PRODH/POX zależną apoptozę/autofagię w linii komórkowej C32 poprzez generację RTF, zapewnia również substrat (Pro) dla PRODH/POX zależnej apoptozy poprzez hamowanie biosyntezy kolagenu.

Na dalszych stronach rozprawy odnajdziemy *Wykaz rycin i tabel*, zawierający opisy 40 rycin i jednej tabeli. Podobnie jak wspomniany już wcześniej wykaz stosowanych skrótów również i ten wykaz ułatwia analizę tekstu.

Kolejny fragment dysertacji zatytułowany *Zgoda Komisji Bioetycznej*, zawiera informację, że z uwagi na fakt prowadzenia badań na wyłącznie komercyjnie dostępnych liniach komórkowych, zgoda tej komisji nie jest wymagana.

Dalsze strony tekstu zawierają streszczenie w języku polskim i angielskim. Trzeba podkreślić, że choć objętościowo ta część maszynopisu stanowi niewielki fragment całości, to jednak jest bardzo ważna, bowiem często to właśnie od streszczenia zależy, czy czytelnik zechce się zapoznać z całością dzieła. W przekonaniu recenzenta, zadanie to zostało spełnione.

Ostatnią część rozprawy zajmuje *Bibliografia* licząca 253 pozycje źródłowe, obejmujące lata 1952-2020, ze zdecydowaną przewagą prac, które ukazały się po roku 2000. Wszystkie te pozycje, jak już wspomniano wcześniej, zostały umiejętnie dobrane i użyte w tekście pracy. Świadczy to o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktoranta do badań prezentowanych w rozprawie i z pewnością ułatwiło zrozumienie zjawisk i procesów, które Kandydat do stopnia naukowego doktora obserwował podczas wykonywanych eksperymentów.

Należy przyznać, że rozprawa, mimo złożonej, specjalistycznej tematyki, została napisana starannie. Jednakże, pomimo korekty autorskiej, w tekście pracy można napotkać drobne błędy edytorskie. Z obowiązku recenzenckiego wymienię kilka z nich. Na stronie 5, w *Wykazie stosowanych skrótów* napisano „GLUT-4 transporter glukozy-1” a powinno być „GLUT-4 transporter glukozy-4”. Na stronie 17, w wersie 23, jest: „Przepuszcza się, że związane to jest z modulacją ...” zamiast: „Przypuszcza się, że związane to jest z modulacją ...”. Strona 20, wers 15, zdanie „Aktywowane białko Bid (tBid) obniża zależny od białek Bax/Bak potencjał błony mitochondrianej.” powinno brzmieć: „Aktywowane białko Bid (tBid) obniża zależny od białek Bax/Bak potencjał błony mitochondrialnej.” Na stronie 61, wers 7 od dołu, jest: „... po 24- i 48-godzinnej inkubacji z metofrminą...”, zamiast „... po 24- i 48-godzinnej inkubacji z metforminą...”. Podobną literówkę napotkamy w przedostatnim wersie tej strony: „... metofminy” zamiast „metforminy”.

Wracając do zrealizowanych badań należy podkreślić, że zostały one zaplanowane i wykonane prawidłowo. Jednak, analizując całość dzieła, zabrakło mi szczegółów odnoszących się do analizy statystycznej. Doktorant w opisie wspomniał o analizie wariancji i sprawdzaniu rozkładu normalnego, ale nie napotkałem informacji o ocenie wariancji. Czy była ona wykonana? Druga kwestia dotyczy prezentacji danych. Prawie wszystkie wyniki badań zaprezentowano w formie wykresów i czuję lekki niedosyt z powodu braku wyników stabelaryzowanych, w których można odnaleźć wiele interesujących, konkretnych danych liczbowych. Co zdecydowało o takiej formie prezentacji wyników?

Chcę zaznaczyć, że moje uwagi nie wpływają negatywnie na całościową ocenę pracy, którą oceniam wysoko. Mam jednak nadzieję, że przybliżenie tych szczegółów stanie się przyczynkiem do ciekawej dyskusji podczas publicznej obrony.

Po dokładnym zapoznaniu się z całością tekstu rozprawy stwierdzam, że została napisana prawidłowo, ładną polszczyzną i stanowi oryginalne osiągnięcie mgr. farm. Karola Rólkowskiego, wnoszące nowe istotne dane do prezentowanej tematyki badawczej. Należy zaznaczyć ważną i aktualną tematykę, której dotyczy rozprawa. Cel badań został jasno zdefiniowany, pomiary zostały właściwie zaplanowane i wykonane. Dyskusja wyników jest wyważona, poparta wynikami eksperymentów i aktualnym piśmiennictwem, co jednoznacznie świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Kandydata ubiegającego się o stopień naukowy doktora w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska, pt.: *Wpływ metforminy na proces POX-zależnej apoptozy/autofagii w komórkach czerniaka 32* spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, tym samym wnioskuję do Wysokiego Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr. farm. Karola Rólkowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Katedry Biofarmacji

prof. dr hab. Adam Buciąński