

Prof. dr hab. Monika Wujec

Lublin, 19.06.2022

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Supruniuk pt. "Ocena udziału mucyny 1 w procesie apoptozy wywołanej pirazolo-berenilowymi pochodnymi platyny(II) w komórkach raka żołądka i raka jelita grubego" wykonanej w Zakładzie Chemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Nowotwory złośliwe stanowią drugą przyczynę zgonów w Polsce powodując w 2019 roku ponad 25% zgonów mężczyzn i ponad 23% zgonów kobiet. W ciągu ostatnich lat liczba zgonów spowodowanych nowotworami złośliwymi wzrosła 2,5-krotnie. Pomimo tak przerażających danych zachorowalność na nowotwory złośliwe w Polsce jest u obu płci niższa niż średnia dla krajów Unii Europejskiej. Rokrocznie rosną również wskaźniki przeżyć zarówno 1-roczone, świadczące o skuteczności leczenia podstawowego, jak i 5-letnie wskazujące na ogólny poziom leczenia. Są to dane dość optymistyczne. Być może spowodowane szerokim dostępem do programów profilaktycznych czy też kampaniami społecznymi. Obserwowane trendy zachorowalności i umieralności z powodu nowotworów w Polsce są uzależnione z jednej strony od struktury wiekowej populacji (z wiekiem zachorowalność rośnie), z drugiej strony zmianami zachodzącymi w ekspozycji na czynniki rakotwórcze, w tym przede wszystkim związane z paleniem papierosów. W 2019 roku w Polsce więcej kobiet zmarło z powodu raka płuc niż z powodu raka piersi. Nasze społeczeństwo starzeje się, więc problem chorób nowotworowych będzie się nasilał. Pomimo szerokiego dostępu do wielu terapii, mimo wynalezienia nowych leków wciąż istnieje potrzeba poszukiwania nowych terapeutyków, skutecznych a jednocześnie bezpiecznych. Największy postęp w leczeniu nowotworów przypisywany jest terapii celowanej. Molekularny mechanizm działania leków stosowanych w terapii celowanej opiera się na blokowaniu lub czasowym zatrzymaniu procesów związanych z rozwojem nowotworu.

Najważniejsze dwie grupy obecnie stosowanych leków w terapii celowanej obejmują przeciwciała monoklonalne oraz niskocząsteczkowe inhibitory kinaz tyrozynowych. Stosowanie przeciwciał monoklonalnych związane jest z ich selektywnym oddziaływaniem ze ściśle zdefiniowanym celem molekularnym w komórkach nowotworowych.

Jednym z obiecujących celów w terapii przeciwnowotworowej jest transbłonowa glikoproteina typu I - mucyna 1 (MUC1), której nadmierną ekspresję wykazano w nowotworach pochodzenia nabłonkowego, w szczególności w raku piersi. Znane są przeciwciała monoklonalne działające poprzez MUC-1 np. GP1.4, C595, anti-hMUC1.

Z danych literaturowych wynika, że połączenie przeciwciał monoklonalnych z radioizotopami czy lekami może prowadzić do zwiększenia ich aktywności przeciwnowotworowej jak też do zwiększenia bezpieczeństwa terapii.

Badania prowadzone w zespole Pani prof. Anny Bielawskiej nad wykorzystaniem przeciwciała anti-MUC1 skojarzonego z berenilowym kompleksem platyny(II) potwierdziły wyższą skuteczność terapii skojarzonej wobec komórek raka piersi. Praca doktorska Pani Katarzyny Supruniuk jest kontynuacją badań z wykorzystaniem przeciwciała monoklonalnego anti-MUC-1 oraz związków kompleksowych, pochodnych platyny(II).

Praca doktorska Pani Katarzyny Supruniuk została przedstawiona do recenzji w formie cyklu trzech publikacji opublikowanych w latach 2021-2022, w czasopiśmie o łącznym współczynniku oddziaływania $IF = 16,214$, opatrzonych 24 stronicowym komentarzem w języku polskim. Prace mają charakter opracowań wieloautorskich. We wszystkich Doktorantka jest pierwszym autorem. Dołączone do komentarza oświadczenia współautorów wskazują na dominujący udział Doktorantki w wykonaniu badań oraz tworzeniu manuskryptów (60-70%). Komentarz zawiera *Wykaz stosowanych skrótów*, *Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej*, *Wstęp*, *Cel pracy*, opis badań (*Materiały i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja i podsumowanie*), *Wnioski*, *Literaturę*, *Streszczenie* w języku polskim i angielskim. Na końcu Doktorantka umieściła ankietę dorobku naukowego. Komentarz jest napisany poprawnym językiem. Oparty jest na 79 pozycjach literaturowych, dobranych i cytowanych właściwie. We wstępie Pani Katarzyna Supruniuk przedstawia ogólną charakterystykę mucyn oraz szczegółowo opisuje jedno z białek – mucynę 1, budowę, funkcje oraz znaczenie w procesach nowotworzenia. Ten krótki wstęp wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w dysertacji oraz uzasadnia wybór przeciwciała anti-MUC1 oraz kompleksów platyny(II) do badań, ale nie daje odpowiedzi na pytanie, dlaczego właśnie te linie komórek nowotworowych zostały użyte do badań.

Celem pracy było zbadanie wpływu dwóch kompleksów pirazolo-berenilowych platyny(II) na proces apoptozy w komórkach raka żołądka i raka jelita grubego, w których funkcja MUC1 została ograniczona przez zastosowanie przeciwciała monoklonalnego anti-MUC1. Doktorantka cel pracy zrealizowała poprzez:

- ocenę cytotoksyczności dwóch zastosowanych kompleksów platyny(II) PtPz4 oraz PtPz6, cis-platyny i anti-MUC1 w stosunku do raka żołądka i raka jelita grubego
- ocenę indukcji apoptozy w komórkach traktowanych pochodnymi pirazolo-berenilowymi
- ocenę wpływu PtPz4, PtPz6, cis-platyny zastosowanych pojedynczo i w skojarzeniu z przeciwciałem monoklonalnym na ekspresję:
 - mRNA i glikoproteiny MUC1
 - jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B (NF-κB), kinazy B (Akt) i białka p53
 - białek pro- i anti-apoptotycznych
 - kaspaz – inicjującej i wykonawczej
 - antygeny Tn, T i cukrowych struktur sialowanych sTn i sT

Metodologia przeprowadzonych badań biologicznych nie budzi zastrzeżeń.

Uzyskane wyniki cytotoksyczności wskazały na znacznie wyższą aktywność (nawet 7-krotną) pirazolo-berenilowych kompleksów platyny(II) niż cisplatyny w stosunku do komórek linii raka żołądka (CRL-1739) i obu raka jelita grubego (DLD-1 i HT-29). W tym miejscu chciałabym zapytać czy były prowadzone badania zastosowanych związków kompleksowych na komórkach prawidłowych? Jeśli tak, jakie wyniki otrzymano? Jeśli nie, dlaczego?

Kolejno mgr Katarzyna Supruniuk zbadala wpływ kompleksów platyny(II), cisplatyny oraz anti-MUC1 na indukcję apoptozy. Badane pochodne berenilowe indukowały apoptozę w komórkach wszystkich trzech badanych linii. Najsilniejsze działanie stwierdziła w przypadku podawania skojarzonego przeciwciała oraz PtPz6. Następnie Doktorantka używając metody real-time PCR oraz testu Elisa oceniła ekspresję mucyny MUC1 w komórkach badanych linii po zastosowaniu przeciwciała anti-MUC1. Zaobserwowała w każdym przypadku obniżenie poziomu mRNA MUC1 oraz spadek ekspresji białka w medium komórkowym. Badanie wpływu kompleksów platyny(II), cisplatyny oraz anti-MUC1 podanych pojedynczo i w skojarzeniu na ekspresję NF-κB, kinazy B (Akt) i białka p53 pozwoliło na stwierdzenie, że zahamowanie szlaku Akt oraz ekspresji NF-κB a także stymulacja p53 jest jednym z możliwych kierunków pro-apoptycznego działania anti-MUC1.

Kolejno badano wpływ kompleksów platyny(II) zastosowanych w monoterapii, jak również w połączeniu z przeciwciałem monoklonalnym anti-MUC1 w porównaniu z cisplatyną oraz przeciwciałem zastosowanym z cisplatyną na czynniki anti- i proapoptotyczne. Oceniono wpływ badanych związków na białka Bcl-xL oraz Bcl-2. W tym przypadku również zaobserwowano, że kombinacja kompleksów z anti-MUC1 w porównaniu do monoterapii znacząco hamuje ekspresję Bcl-xL mRNA. W kolejnym etapie prac badawczych Doktorantka sprawdziła czy badane związki inicjują apoptozę poprzez wpływ na czynniki proapoptotyczne: białka Bax, Bad, Bid i Bim oraz kaspazy (-3,-9). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziła, że pirazolo-berenilowe kompleksy platyny(II) w połączeniu z anti-MUC1 mogą wpływać na wzrost ekspresji mRNA ww. białek. Zarówno monoterapia, jak również zastosowanie przeciwciała w połączeniu z pirazolo-berenilowymi kompleksami platyny oraz cisplatyną indukowało proces apoptozy na drodze wzmocnienia ekspresji mRNA kaspazy-9 i 3.

Ostatnim etapem prac badawczych było określenie wpływu badanych związków na ekspresję antygenów cukrowych. W stanach patologicznych, w tym w nowotworach, obserwuje się zmiany profilu glikozylacji białek, czego konsekwencją jest pojawianie się antygenów cukrowych związanych z nowotworem (TA-CAs). Doktorantka wykazała, że skojarzone działanie badanych związków powodowało obniżenie ekspresji antygenów Tn, T, sTn i sT. Blokowanie ekspresji TACAs związanych z MUC1 może być potencjalnym celem terapii przeciwnowotworowej.

Stwierdzam, że Doktorantka zrealizowała wszystkie cele badawcze. Otrzymane w wyniku przeprowadzonych badań wyniki potwierdzają większą efektywność terapii skojarzonej (przeciwciało monoklonalne plus badany związek) w porównaniu z monoterapią. Strategia polegająca na zastosowaniu pirazolo-berenilowego kompleksu platyny(II) wraz z przeciwciałem monoklonalnym anti-MUC1 stanowi alternatywę monoterapii oraz leczenia nowotworów jelita grubego oraz żołądka.

Podsumowując, uważam iż praca mgr Katarzyny Supruniuk jest przykładem dobrze zaplanowanej i wykonanej pracy badawczej. Autorka wykazała się wiedzą teoretyczną, konieczną do prowadzenia badań naukowych, umiejętnością wyciągania wniosków z prowadzonych obserwacji, bardzo dobrze opanowała warsztat badawczy. Na uwagę zasługuje również dorobek publikacyjny Doktorantki. Oprócz trzech publikacji stanowiących cykl, Pani Supruniuk jest współautorką jeszcze czterech wysokopunktowych publikacji w prestiżowych czasopiśmie o łącznym współczynniku oddziaływania równym 17,038. Ponadto, brała czynny udział w konferencjach naukowych, zarówno w Polsce (6), jak i za granicą (2)

prezentując wyniki swoich badań w formie wystąpień ustnych i prezentacji posterowych. Była kierownikiem czterech grantów ze środków Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Rozprawa doktorska Pani Katarzyny Supruniuk w pełni spełnia wymagania stawiane tego typu rozprawom naukowym, dlatego wnoszę do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o nadanie mgr Katarzynie Supryniuk stopnia doktora nauk medycznych.

Stanisław Wąja

...that two of them were ...
...the ...
...the ...
...the ...
...the ...
...the ...