

Kraków, 07.01.2022

UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE



Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Farmaceutycznej
30-688 Kraków, ul. Medyczna 9
Tel. +48 12 620 54 50

Kierownik – prof. dr hab. Marcin Kołaczkowski

RECENZJA

rozprawy doktorskiej p.t. „Molekularny mechanizm przeciwnowotworowego działania wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych jako agonistów receptora PPAR γ w eksperymentalnym modelu raka piersi”, wykonanej przez mgr. farmacji Adama Kazberuka, doktoranta w Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, pod kierunkiem promotora – dr. hab. Arkadiusza Surżyńskiego.

Recenzja została opracowana na zlecenie Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, w oparciu o art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (z późn. zm.), dotyczący wymagań stawianym rozprawom doktorskim.

Mgr farm. Adam Kazberuk przedstawił rozprawę doktorską w formie pracy pisemnej o wskazanym wyżej tytule, co jest zgodne z wymaganiami ustawowymi dotyczącymi formy rozprawy doktorskiej (art. 187 pkt. 3). Rozprawa liczy 125 stron maszynopisu i ma klasyczny układ, umożliwiający pełne zrozumienie poruszanych zagadnień oraz ich ocenę. Zasadnicza część merytoryczna poprzedzona jest szczegółowym spisem treści oraz bogatym wykazem skrótów, co istotnie ułatwia nawigację po rozbudowanym tekście, a także pozwala na szybkie zrozumienie wszystkich licznie przywoływanych terminów. Podobne wsparcie dla czytelnika stanowi zamieszczony w końcowej części pracy wykaz rycin i tabel.

We wstępie, Doktorant przedstawił bardzo szeroko tło naukowe rozprawy. Poruszane zagadnienia są bardzo zróżnicowane i stanowią doskonale wprowadzenie do badań stanowiących *novum* w części eksperymentalnej pracy. Szczegółowo został wyjaśniony kontekst rozważania niesteroidowych leków przeciwzapalnych w terapii przeciwnowotworowej, w tym rola enzymów powiązanych tradycyjnie z aktywnością NLPZ, takich jak cyklooksygenaza czy lipooksygenaza. Z uwagi na treść planowanych eksperymentów, Doktorant szczegółowo opisał także znaczenie receptorów PPAR, tak na poziomie podstawowym jak i ściśle w kontekście aktywności NLPZ, z których część jest istotnymi aktywatorami tych receptorów. Omówienie celów biologicznych dla działania leków zamyka charakterystyka kluczowych z punktu widzenia prowadzonych rozważań enzymów, zaangażowanych w metabolizm proliny, takich jak dehydrogenaza prolinowa/oksydaza prolinowa (PRODH/POX) i prolidaza. W dalszej części wstępu scharakteryzowane są zjawiska apoptozy i autofagii, istotne z punktu widzenia mechanizmu aktywności przeciwnowotworowej badanych leków. Ostatnim aspektem poruszonym w części wstępnej są nowoczesne eksperymentalne modele komórkowe wykorzystywane w badaniach biologii nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem przełomowej metody CRISPR/Cas, zastosowanej w badaniach stanowiących przedmiot niniejszej rozprawy. Uwagę zwraca zarówno właściwy dobór tematów poruszonych w części wstępnej, jaki wysoki poziom merytoryczny i językowy wypowiedzi. **Świadczy to jednoznacznie o wysokiej ogólnej wiedzy teoretycznej Doktoranta w zgłębianej dyscyplinie naukowej, a co za tym idzie stanowi bardzo istotny przyczynek do spełnienia wymogu zawartego w art. 187 pkt.1 Ustawy.**

W dalszej części rozprawy sformułowany został cel pracy doktorskiej, którym jest ocena udziału PRODH/POX w procesie apoptozy indukowanej NLPZ. **Cel pracy został sformułowany prawidłowo**, zarówno biorąc pod uwagę szeroki kontekst medyczno-biologiczny, jak i stan badań stanowiących tło naukowe dla działań doktoranta. Jest to cel konkretny, naukowo zasadny i nie przesadzony w swoim zakresie. Uważam, że tak czytelne wskazanie celu pracy należy ocenić pozytywnie, szczególnie biorąc pod uwagę jego prawidłową realizację, co opiszę dalej.

W dalszej części pracy przedstawione zostały **użyte materiały oraz zastosowane metody badawcze**. Badania objęły testy cytotoksyczności, z użyciem testu MTT oraz cytometrii przepływowej, ocenę stopnia biosyntezy DNA i kolagenu w oparciu o pomiary radioaktywności, ocenę aktywności prolidazy i stężenia aminokwasów z użyciem technik spektrofotometrycznych i

LC/MS. Doktorant posłużył się metodami elektroforetycznymi do rozdzielania białek, a także metodą Western Blot do analizy ekspresji białek. Metody fluorescencyjne zostały użyte do analizy ekspresji białek przy pomocy bioobrazowania, oraz do przyżyciowego oznaczenia reaktywnych form tlenu. Analiza ekspresji genów wykonana została metodą qRT-PCR. Co szczególnie godne uznania, w swych badaniach Doktorant posłużył się nie tylko natywną linią komórkową raka piersi MCF-7, ale także klonem z wyłączonym genem PRODH/POX, który sam opracował. Wykazał się przy tym nie tylko umiejętnością prowadzenia hodowli komórkowych i eksperymentów w systemach komórkowych, ale także umiejętnością samodzielnego uzyskania klonu modyfikowanego genetycznie. **Na uznanie zasługuje nie tylko szczegółowy opis, ale przede wszystkim szeroki zakres użytych metod badawczych**, potwierdzający że Doktorant legitymuje się nie tylko dużą wiedzą teoretyczną, ale także bogatym warsztatem naukowym.

Dalej przedstawione zostały **wyniki badań własnych, które zostały opisane szczegółowo i rzetelnie**, z zastosowaniem licznych rycin, bogato opisanych, co znacznie ułatwia zapoznanie się z wynikami. Następująca dalej **dyskusja jest przeprowadzona bardzo sprawnie, podsumowując najważniejsze założenia pracy i umieszczając w ich kontekście wnioski z badań własnych**. Co istotne, wyniki własne i wyciągane na ich podstawie konkluzje są konfrontowane z piśmiennictwem w temacie, osadzając je w szerszym kontekście. Cytowana w całej rozprawie literatura zawiera 159 pozycji, uwzględniając zarówno klasyczne publikacje, które kształtowały aktualnie rozwijane trendy, jak i najnowsze osiągnięcia w tematyce rozprawy, zapewniając jej aktualność na tle stanu techniki.

Do najważniejszych osiągnięć Doktoranta należy zaliczyć:

1. Wykazanie, że cytotoksyczne działanie badanych związków z grupy NLPZ oraz troglitazonu względem linii komórkowej raka piersi MCF-7 realizowane jest w mechanizmie apoptozy.
2. Potwierdzenie że proces ten jest zależny od aktywacji PRODH/POX.
3. Opisanie kaskady efektów w linii natywnej, uwzględniającej aktywację receptora PPAR γ , wzrost ekspresji PRODH/POX, nasilenie tworzenia RFT i dalej wzrost ekspresji aktywnej kaspazy 9, aktywację PARP oraz ekspresję i translokację p53 (aktywacja apoptozy w mechanizmie wewnątrzpochodnym).

4. Wykazanie wpływu hamującego NLPZ na biosyntezę kolagenu oraz pobudzającego tzw. „cykl prolinowy” w komórce.
5. Samodzielne stworzenie unikalnego, stabilnego klonu komórek raka piersi MCF-7 z wyłączonym genem PRODH/POX (knock-out, MCF-7^{POX-KO}), z zastosowaniem techniki CRISPR/Cas9.
6. Wykazanie, że efektem proapoptotycznym NLPZ w MCF-7^{POX-KO} nie towarzyszy wzrost RFT oraz, że realizowane są w mechanizmie zewnątrzpochodnym, o czym świadczy między innymi wzrost ekspresji aktywnej kaspazy 8.
7. Stwierdzenie nasilonego zahamowania syntezy kolagenu oraz zwiększonej aktywności prolidazy, zwiększonego stężenia proliny, kwasu glutaminowego i glutaminy w MCF-7^{POX-KO}, względem linii natywnej, wskazujące na istotne powiązanie nasilenia efektu proapoptotycznego w tym klonie z zaburzeniem procesów przemiany proliny.

Wskazane powyżej osiągnięcia mają charakter nowatorski i w sposób jednoznaczny potwierdzają, że **w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej dokonano sformułowania a następnie oryginalnego rozwiązania problemu naukowego, wypełniając tym samym wymagania art. 187 pkt. 2.**

Uważam, że całokształt przedstawionych przez doktoranta wyników oraz prawidłowo przeprowadzona dyskusja **dodatkowo potwierdzają jego szeroką wiedzę teoretyczną w zgłębianej dyscyplinie naukowej**, a także wskazują, że **wykazuje on umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, wypełniając tym samym całkowicie wymagania art. 187, pkt. 1.**

Umieszczone w końcowej części pracy wypunktowane wnioski oraz zwięzłe streszczenie dobrze oddają najważniejsze tezy pracy i ułatwiają ich rekapitulację.

Wysokiej wartości naukowej towarzyszy wysoka jakość rozprawy w zakresie edycji. Recenzując pracę odnalazłem jedynie nieliczne błędy literowe, które postanowiłem przekazać Doktorantowi osobiście. Jedyną uwagą, którą mam w zakresie nomenklatury jest użycie angielsko brzmiącej nazwy chemicznej grupy leków przeciwcukrzycowych, agonistów PPAR γ - „tiazolidinediony”. Jako że rozprawa przygotowana jest w języku polskim, warto zachować formę polską – „tiazolidynodiony”. Jest to jednak drobiazg, który jako wyjątek, wydaje się jedynie

potwierdzać wysoką jakość przedłożonej dysertacji i podobnie jak wspomniane wyżej nieliczne uchybienia edytorskie, w żadnym razie nie umniejsza jej wysokiej wartości.

Analizując bardzo ciekawe wyniki badań i konkluzje zawarte w dyskusji nasunęły mi się pewne pytania, o odpowiedź na które chciałbym prosić Doktoranta w czasie obrony:

1. Czym był podyktowany wybór do badań akurat linii MCF-7? W pierwszym rzędzie chciałbym zapytać o samego raka piersi, czy istnieją przesłanki że NLPZ mogą być skuteczniejsze w leczeniu tego nowotworu, niż innych, dla których wykazano aktywność przeciwnowotworową NLPZ? Dlaczego akurat MCF-7, a nie inna linia raka piersi? Czy Doktorant uważa, że wyniki otrzymane dla linii MCF-7 są możliwe do uogólnienia na inne linie komórkowe, czy badania z ich użyciem mogłyby przynieść inne/dodatkowe informacje?
2. Jakie były kryteria wyboru stężeń badanych leków? Czy wybrano je w oparciu o wyniki innych badań, jeżeli tak to jakich? Czy takie stężenia są osiągalne w organizmie, przy założeniu zastosowania badanych leków w dawkach tolerowanych oraz biorąc pod uwagę ich dość wysokie wiązanie z białkami (relatywnie niską frakcją wolną)? Jak NLPZ w takich stężeniach wpływają na komórki nietransformowane nowotworowo, np. fibroblasty lub HUVEC?
3. Czy sulindak był stosowany w formie utlenionej (zwykle wybieranej do badań in vitro)? Czy też w przypadku mechanizmu „nie COX” nie ma to znaczenia?
4. Dlaczego jako agonistę PPAR γ wybrano troglitazon, który jest wycofany z uwagi na toksyczność, a nie np. pioglitazon, stosowany aktualnie w leczeniu? Czy związek ten posiada jakieś specjalne właściwości, czy raczej chodzi o spójność z wcześniej generowanymi wynikami otrzymanymi z jego udziałem (co jest zasadne)?
5. Czy Doktorant widzi jakąś unikalną właściwość/zaletę NLPZ w kontekście stymulacji PRODH/POX via PPAR γ , czy ten sam efekt można by otrzymać stosując agonistów PPAR γ pozbawionych wpływu na COX? Czy może istnieć jakaś synergia między tymi mechanizmami, jeśli tak to jaka?
6. Czy różnice pomiędzy komórkami nowotworowymi i zdrowymi w zakresie aktywności PRODH/POX są wystarczająco duże, aby ten mechanizm był w stanie selektywnie

ograniczać rozwój nowotworu, nie szkodząc komórkom zdrowym? Gdzie leży różnicowanie?

7. W jaki sposób można by w przyszłości podejść do wykorzystania PRODH/POX jako punktu uchwytu terapii przeciwnowotworowej? Czy przez zastosowanie aktualnie dopuszczonych leków w jakimś specyficznym schemacie dawkowania? Czy Doktorant widzi możliwość optymalizacji oddziaływania na PRODH/POX w sposób efektywniejszy, z użyciem nowych substancji chemicznych? Jeśli tak, to ew., na czym ta optymalizacja miałaby polegać?

Reasumując, **oceniana rozprawa doktorska stanowi oryginalny i indywidualny wkład doktoranta w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych**, stanowiąc ważne uzupełnienie badań wcześniejszych oraz inspirację do dalszych eksploracji w poruszonym temacie. Tak jak wyżej szczegółowo wskazałem, **spełnia ona wszystkie wymagania zawarte w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (z późn. zm.)**. Warto dodać, że doktorant legitymuje się także innymi osiągnięciami istotnymi z punktu widzenia awansu naukowego. A mianowicie, był On kierownikiem grantu PRELUDIUM, o czym informacja została zawarta w pracy doktorskiej, wskazując właściwie źródło finansowania badań. Jest także współautorem kilku publikacji naukowych o tematyce zbieżnej z tematem rozprawy doktorskiej, o czym informację powziąłem z bazy PubMed. Co więcej, na stronie Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku znalazłem informację, że p. mgr. Adam Kazberuk został zakwalifikowany do programu stażowego BioLabw Oklahoma Medical Research Foundation, będącego jednym z programów stażowych prestiżowej fundacji Fulbrighta, a także że był słuchaczem studiów podyplomowych na kierunku Biologia Molekularna na Uniwersytecie Jagiellońskim. Wszystkie te informacje świadczą nie tylko o wypełnieniu wymogów ustawowych, ale o posiadaniu przez Doktoranta przymiotów w pełni predestynujących go do awansu na stopień doktora oraz do dalszego rozwoju naukowego.

Mając na uwadze wszystko powyższe, z pełnym przekonaniem składam wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr. Adama Kazberuka i dopuszczenie go do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysoką wartość przedłożonej dysertacji, składam także wniosek o jej wyróżnienie.

Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM
Zakład Chemii Leków

prof. dr hab. Marcin Kosiński
Kierownik