



Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz
Katedra Biofizyki Molekularnej
Uniwersytetu Łódzkiego

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Palko-Łabuz pt. „Analiza wybranych mechanizmów molekularnych związanych z wpływem statyn i flawonoidów na komórki linii raka jelitka grubego LoVo i LoVo/Dx”

W obliczu zagrożenia, jakie stanowi dla współczesnego człowieka choroba nowotworowa, poszukiwanie nowych związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym i wyjaśnianie mechanizmów ich działania jest nie tylko interesującym, ale potencjalnie niezwykle cennym nurtem badań. W tym nurcie osadzone są badania dotyczące dwóch grup związków: flawonoidów i statyn, a w szczególności łącznego działania związków obu tych grup na komórki nowotworowe *in vitro*, podsumowane w rozprawie doktorskiej mgr inż. Anny Palko-Łabuz.

Świetnie napisana rozprawa doktorska mgr inż. Anny Palko-Łabuz ma klasyczny układ. Rozpoczyna ją *Wstęp* („Część teoretyczna”) przedstawiający w kompetentny sposób raka jelita grubego jako jeden z najczęściej występujących nowotworów złośliwych, zjawisko oporności wielolekowej, strukturę i aktywność biologiczną flawonoidów, rolę flawonoidów w odwracaniu zjawiska oporności wielolekowej, aktywność biologiczną statyn i przeciwnowotworowe działanie statyn. Za szczególnie interesujące uważam przedstawienie roli transporterów ABC w determinowaniu oporności wielolekowej oraz oddziaływania flawonoidów i statyn z tymi transporterami. „Część teoretyczna” jest dobrym wprowadzeniem do części doświadczalnej rozprawy.

Celem badań podsumowanych w rozprawie było zbadanie wpływu wybranych związków z obu grup na komórki raka jelita grubego linii LoVo i LoVo/Dx (linii wrażliwej i linii odpornej na cytostatyki), w tym ocenę cytotoksycznego i cytostatycznego działania badanych związków oraz kombinacji wybranych związków obu grup, sprawdzenie, czy związki te wykazują zdolność do modulacji oporności komórek linii lekoopornej LoVo/Dx na działanie doksorubicyny i ocenę wpływu badanych substancji na poziom ekspresji genów kodujących transportery wielolekowe. Dodatkowym celem badań było określenie wpływu wybranych flawonoidów i statyn na modelowe układy lipidowe. Wytyczone cele badań są ambitne i obszerne.

Materiały i metody opisane są należycie szczegółowo. Doktorantka stosowała szereg nowoczesnych metod biochemii, biologii molekularnej i biologii komórki, w tym oznaczanie aktywności cytotoksycznej za pomocą sulforodaminy B, wyciszanie genów techniką siRNA, oznaczanie poziomu ekspresji genów kodujących główne transportery wielolekowe, techniki elektroforezy DNA i białek, technikę Western blot, oznaczanie apoptotycznej degradacji DNA, aktywności kaspazy 3 i poziomu białka PCNA oraz badania błon lipidowych techniką skaningowej mikrokalorymetrii różnicowej (oznaczanie temperatury przejścia fazowego dipalmitoilofosfatydylocholiny, entalpii i kooperatywności przejścia fazowego lipidu). Warsztat metodyczny opanowany i stosowany przez Doktorantkę budzi moje uznanie.

Wykonane obszerne badania zaowocowały wieloma interesującymi oryginalnymi wynikami, które zostały właściwie przeanalizowane i przedstawione i w sposób przejrzysty i atrakcyjny graficznie. Uzyskane wyniki oceniam bardzo wysoko; w recenzji chcę odnieść się tylko do niektórych z nich.

Wybór do badań polifenoli o stosunkowo prostej strukturze – dwunastu flawonów i flawanonów różniących się ilością i położeniem podstawników –OH lub –OCH₃ – był moim zdaniem słuszny, bowiem umożliwił porównanie wpływu struktury i hydrofobowości cząsteczek na ich cytotoksyczność. Doktorantka wykazała m. in., że występowanie grupy metoksylowej w pozycji 7 flawonoidu oraz podwójnego wiązania pomiędzy atomami węgla 2 i 3 w pierścieniu flawonu jest istotne dla aktywności cytotoksycznej w stosunku do linii lekoopornej LoVo/Dx oraz że grupa metoksylowa w pozycji 6 lub 7 ma znaczenie dla możliwości modulowania lekooporności komórek tej linii na doksorubicynę. Badania wykazały także, że spośród flawanonów, 7-metoksyflawanon najsilniej hamuje proliferację komórek obu badanych linii, zaś spośród wszystkich badanych flawonoidów najsilniejszym inhibitorem proliferacji komórek jest wogonina.

Cytotoksyczne działanie bajkaleiny i luteoliny wobec komórek LoVo/Dx zwiększyło się w wyniku wyciszenia nadekspresji transportera P-gp; Autorka rozprawy sugeruje na tej podstawie możliwość transportu obu flawonoidów przez P-gp. Sugestia ta wydaje się słuszna; celowe byłoby doświadczenie takiej możliwości w dalszych badaniach.

Interesujące było wykazanie cytotoksycznego działania dwóch statyn – simwastatyny i mewastatyny wobec komórek LoVo i LoVo/Dx, a szczególnie ciekawe są wyniki badań łącznego działania flawonoidów i statyn na oporność komórek na doksorubicynę. Donoszono już o przeciwnowotworowym działaniu statyn; dane Doktorantki wskazują na niektóre

potencjalne mechanizmy tego efektu. Ta linia badań dotycząca interakcji pomiędzy środkami działającymi przeciwnowotworowo i modulującymi oporność wielolekową wydaje się bardzo perspektywiczna. Doktorantce udało się wykazać zarówno synergistyczne efekty cytotoksyczne (np. przy łącznym stosowaniu simwastatyny z 6-hydroksyflawonem, 6-metoksyflawonem, bajkaleiną i wogoniną), jak i przypadki obniżenia cytotoksycznego działania statyn w obecności flawonoidu (chryzyny).

Inne interesujące stwierdzenie dotyczyło stymulacji wzrostu komórek nowotworowych pod wpływem niskich stężeń flawonoidów, które w wyższych stężeniach mają działanie cytotoksyczne. Podzielam zdanie Doktorantki, że zjawisko to może być przejawem hormezy.

Kolejna ciekawa seria wyników wykazuje zróżnicowany wpływ badanych substancji na poziom ekspresji genów kodujących trzy główne transportery wielolekowe, obejmujący zarówno obniżenie jak i podwyższenie poziomu ekspresji. Doświadczenia, ze zrozumiałych względów, przeprowadzone zostały dla jednego stężenia badanych substancji; można przypuszczać, że obraz ten skomplikowałby się jeszcze bardziej, gdyby objąć badaniami zależność poziomu ekspresji tych genów w zależności od stężenia substancji modulujących; niewykluczone, że postulowany efekt hermetyczny przejawiłby się również na tym poziomie.

Obniżenie poziomu ekspresji genów kodujących transportery wielolekowe może być bardzo cennym efektem z klinicznego punktu widzenia i z pewnością warto jest dalszych badań. Doktorantka nie obserwowała wprawdzie korelacji pomiędzy obniżeniem poziomu głównych transporterów wielolekowych (P-gp, BCRP i bMRP1) na poziomie transkryptu, jak i na poziomie białka pod wpływem luteoliny a opornością komórek na doksorubicynę. W dalszych badaniach dobrze warto byłoby określić lokalizację wewnątrzkomórkową tych białek i zastosować testy funkcjonalne dla wyjaśnienia tej sytuacji.

Mikrokalorymetryczne badania wpływu flawonoidów i statyn na właściwości modelowych błon lipidowych mogą wydawać się luźno związane z głównymi kierunkami badań podsumowanych w rozprawie, jednak są one ciekawe i ważne, bowiem efekty błonowe tych związków mogą być istotnym elementem ich działania na poziomie komórkowym. W szczególności dotyczyć to może modyfikacji funkcji transporterów wielolekowych w wyniku zmian płynności i innych właściwości dwuwarstwy lipidowej błon komórkowych. Zastosowany układ modelowy (dwuwarstwy 1,2-dipalmitoil-3-fosfatydylocholiny; DPPC) jest wprawdzie nieco odległy od mikrośrodowiska lipidowego

transporterów w błonie plazmatycznej, tym niemniej umożliwi wgląd w mechanizmy oddziaływania badanych związków z fosfolipidami błony. Badania Doktorantki wykazały, m. in. silny wpływ 6-hydroksyflawanonu na parametry przejścia DPPC, co wskazuje na głęboką penetrację tego flawanonu w głąb dwuwarstwy lipidowej. Tego typu informację trudno byłoby uzyskać bez zastosowania układu modelowego. Zastanawiający jest mniejszy, w porównaniu z 6-hydroksyflawanonem, efekt 6-metoksyflawanonu, który jest związkiem bardziej hydrofobowym i można byłoby oczekiwać silniejszej penetracji dwuwarstwy lipidowej w jego przypadku. W pełni zgadzam się z poglądem Doktorantki, że dalsze badania oddziaływania flawonoidów i statyn z dwuwarstwą lipidową winny objąć modelowanie molekularne i spektroskopię NMR.

Trudnością, z jaką zetknęła się Doktorantka była mnogość i różnorodność uzyskanych wyników, nie ułatwiająca ich podsumowania i uogólnienia. Ze zmagania z tym wyzwaniem wyszła, w moim przekonaniu, zwycięsko kończąc prezentację wyników (bez części mikrokalorymetrycznej) obszernym (8-stronicowym) podsumowaniem i przedstawiając analizę istotności statystycznej obserwowanych zmian w postaci 9-stronicowego suplementu.

18-stronicowa *Dyskusja* podsumowuje uzyskane wyniki i konfrontuje je z danymi piśmiennictwa, wystawiając bardzo dobre świadectwo dojrzałości z naukowej Doktorantki. Autorka rozprawy sformułowała 17 wniosków; liczba ta odzwierciedla bogactwo uzyskanych wyników. Spis rycin i tabel jest bardzo przydatny w odnalezieniu konkretnych danych, rozprawa zawiera bowiem 75 rycin i 10 tabel. Praca zaopatrzona jest w *Wykaz skrótów* oraz *Streszczenie* w języku polskim i angielskim. Obszerne cytowane piśmiennictwo obejmuje głównie oryginalne prace anglojęzyczne.

Oprócz powyżej przedstawionych, mam kilka drobnych uwag pod adresem rozprawy. Nomenklatura chemiczna jest nie w pełni konsekwentna; w znakomitej większości stosowane są greckie człony liczebnikowe (np. *dimetylosulfotlenek* itd.), jednak w *Wykazie skrótów* i wykazie stosowanych odczynników znajdziemy kwas etylenodwuaminocztwooctowy i kwas trójchlorooctowy.

Niektórzy biochemicy zżymają się na używany w rozprawie termin „izolacja” (uważając że powinien być stosowany jedynie w obszarze elektrotechniki), a terminem właściwym w odniesieniu do procedury wyodrębniania składników układów biologicznych jest „izolowanie”. Ten termin jest zresztą nieco nadużywany w rozprawie, bowiem Doktorantka używa go opisując otrzymywanie jedynie ekstraktów komórek zawierających

odpowiednie białka (s. 53). Niewłaściwy jest zwrot „jeśli cukrem jest glukozyd” (s. 26). Chcę jednak podkreślić, że rozprawa jest przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim i graficznym.

W podsumowaniu, bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską mgr inż. Anny Palko-Łabuz. Uważam, że rozprawa spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez art. 14 i 15 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Anny Palko-Łabuz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na bardzo szeroki zakres badań, bardzo duży wkład pracy Doktorantki, cenne i oryginalne wyniki oraz staranność przygotowania rozprawy wnoszę o wyróżnienie rozprawy.



Łódź, dnia 23 kwietnia 2015

Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz