

Szczecin, 27.04.2015

Prof. dr hab. Jolanta Tarasiuk
Katedra Biochemii
Wydział Biologii
Uniwersytet Szczeciński

RECENZJA

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

Oporność wielolekowa jest jednym z najistotniejszych problemów w terapii nowotworów. Dotyczy ona często chemioterapeutyków o bardzo zróżnicowanej budowie chemicznej i zupełnie odmiennych mechanizmach działania. Warunkiem powodzenia prac zmierzających do uzyskania skutecznych i selektywnych leków przeciwnowotworowych zachowujących aktywność w stosunku do nowotworów opornych na klasyczną chemioterapię, jak również opracowania efektywnych modulatorów oporności wielolekowej, jest poznanie mechanizmów molekularnych działania projektowanych związków na komórki nowotworowe. Do związków o potencjalnie dużej wartości onkoterapeutycznej należą również polifenole (w tym flawonoidy) pochodzenia roślinnego oraz statyny.

Dlatego też uważam, że cel pracy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Palko-Łabuz, tj. określenie mechanizmów molekularnych związanych z wpływem flawonoidów i statyn na komórki raka jelita grubego linii LoVo i jej sublinii o oporności wielolekowej LoVo/Dx, jest bardzo istotny nie tylko naukowo, ale również ma potencjalnie bardzo duże znaczenie kliniczne. Recenzowana praca doktorska została wykonana w Katedrze i Zakładzie Biofizyki Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr hab. Krystyny Michalak. Jest ona częścią kompleksowych badań prowadzonych przez Promotora rozprawy dotyczących zjawiska oporności wielolekowej oraz chemioterapii eksperymentalnej nowotworów.

Praca doktorska Pani mgr inż. Anny Palko-Łabuz liczy 204 strony, zawiera 75 rysunków i 19 tabel oraz spis literatury liczący 351 pozycji. Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich.

W rozdziale pt. "Część teoretyczna" Autorka rozprawy przedstawiła w sposób zwięzły charakterystykę nowotworów złośliwych jelita grubego, a następnie omówiła główne

mechanizmy oporności wielolekowej komórek nowotworowych. W drugiej części tego rozdziału Doktorantka przedstawiła aktualne dane literaturowe dotyczące aktywności biologicznej i przeciwnowotworowego działania flawonoidów i statyn. Ta część rozprawy świadczy o dobrej i szerokiej znajomości zagadnień bezpośrednio związanych z tematyką pracy doktorskiej. Chciałabym przy tym podkreślić znajomość najnowszej literatury, gdyż znacząca część cytowanych przez Doktorantkę pozycji pochodzi z okresu ostatnich 10 lat. Wśród nich znajdują się również prace najnowsze z lat 2012-2015. Spis literatury został przygotowany w sposób na ogół bardzo staranny, chociaż znajdują się w nim drobne błędy edytorskie, a cytowanie pracy Hendrich A.B. jest niekompletne.

Cel pracy oraz zadania badawcze zostały sformułowane w sposób jasny i nie budzący żadnych wątpliwości merytorycznych. Znacząca część zaplanowanych badań dotyczyła oceny efektu cytotoksycznego różnych związków (flawonoidów, statyn i doksorubicyny, tj. klinicznie używanego leku przeciwnowotworowego) stosowanych samodzielnie, jak również w różnych dwuskładnikowych oraz trójskładnikowych kombinacjach na komórki raka jelita grubego linii LoVo i jej sublinii o oporności wielolekowej LoVo/Dx (odpowiednio z aktywnym, jak i wyciszonym genem *MDR1*, kodującym glikoproteinę P – jedno z głównych białek oporności wielolekowej). Ważnym zadaniem badawczym Doktorantki było również określenie wpływu badanych związków na ekspresję genów *MDR1*, *BCRP* i *MRP1* kodujących białka oporności wielolekowej należące do transporterów ABC odpowiedzialnych za aktywny eksport leków z komórek opornych. Istotnym elementem pracy było też dokonanie oceny wpływu tych związków na poziom antygenu jądrowego proliferujących komórek (PCNA), określenie ich właściwości proapoptotycznych oraz zbadanie wpływu na właściwości termotropowe modelowych błon lipidowych. W celu ustalenia zależności „struktura-aktywność (SAR)” do badań wybrano 15 starannie wyselekcjonowanych flawonoidów należących odpowiednio do flawanonów lub flawonów różniących się między sobą liczbą i położeniem grup hydroksylowych i metoksyłowych. Nie podano natomiast, jakie były kryteria wyboru do badań dwóch wyselekcjonowanych statyn: simwastatyny i mewastatyny. Nie zawsze przedstawiono też w pracy kryteria wyboru określonych flawonoidów do badań ich działania w kombinacjach ze statynami i doksorubicyną.

Opis materiałów i metod badawczych stosowanych w pracy jest wystarczający do interpretacji uzyskanych wyników, jak również do ewentualnego powtórzenia doświadczeń. W rozprawie przedstawiono też metody analiz statystycznych zastosowane w pracy. Stwierdzam, że Doktorantka jest doświadczonym eksperymentatorem, bardzo dobrze znającym nowoczesne metody badawcze. Chciałabym przy tym podkreślić różnorodność

stosowanych w pracy technik z zakresu biologii molekularnej, biochemii, biofizyki oraz farmakologii molekularnej.

Otrzymane przez Doktorantkę wyniki zostały przedstawione na 57 starannie wykonanych rysunkach oraz zestawione w postaci 10 tabel zamieszczonych w podrozdziale 2.4. "Wyniki" oraz 9 tabel znajdujących się w suplemencie rozprawy, które podsumowują rezultaty analiz statystycznych otrzymanych danych eksperymentalnych dotyczących różnic pomiędzy aktywnością cytotoksyczną badanych związków stosowanych samodzielnie oraz w kombinacjach dwuskładnikowych i trójskładnikowych. Przytoczone powyżej liczby świadczą o ogromie pracy wykonanej przez Doktorantkę. Niełatwą interpretację uzyskanych wyników ułatwiają starannie opracowane tabele zbiorcze 8-10. Warto było natomiast zamieścić w rozprawie bardziej szczegółowe legendy do rysunków przedstawiających wyniki przeprowadzonych badań z podaniem m.in. zastosowanych stężeń związków oraz czasu ich inkubacji z komórkami.

Doktorantka stwierdziła zróżnicowany wpływ badanych flawonoidów i statyn zarówno na komórki raka jelita grubego linii LoVo, jak i jej sublinii o oporności wielolekowej LoVo/Dx, działających samodzielnie oraz w kombinacjach. Uzyskane przez nią wyniki dotyczące wpływu badanych związków na ekspresję genów kodujących białka eksportujące ABC, potencjał proliferacyjny komórek, indukcję apoptozy oraz właściwości termotropowe modelowych błon lipidowych wskazują na złożone molekularne mechanizmy ich przeciwnowotworowego działania. Autorka rozprawy starała się dokonać ostrożnej interpretacji uzyskanych wyników, biorąc pod uwagę różnice strukturalne badanych związków. Należy jednak zauważyć, że przy omawianiu niektórych wyników, np. dotyczących wpływu badanych związków na ekspresję genów *MDR1*, *BCRP* i *MRP1*, Autorka rozprawy sugerowała odpowiednio wzrost lub spadek poziomu mRNA i kodujących je białek, podczas gdy zamieszczone wyniki przeprowadzonych analiz wykazały, że obserwowane różnice nie były istotne statystycznie. Duża część badań przeprowadzonych przez Autorkę rozprawy została wykonana przy stałych stężeniach molowych związków np. 50 μM lub 100 μM . Zważywszy jednak na fakt, że badane flawonoidy i statyny mają zróżnicowaną aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek LoVo i LoVo/Dx, wydaje się, że warto byłoby przeprowadzić te oznaczenia również przy stężeniach wywołujących ten sam efekt cytotoksyczny (np. IC_{20} , IC_{50} lub IC_{90}). Doktorantka wskazuje również na synergistyczne działanie niektórych flawonoidów i statyn zastosowanych w układach dwuskładnikowych oraz trójskładnikowych zastosowanych razem z doksorubicyną. Dla wykazania efektu synergii tych związków należałoby jednak przeprowadzić analizy

izobolograficzne służące do oceny interakcji pomiędzy związkami, podawanymi w różnych, ściśle określonych kombinacjach.

Ostrożnie przeprowadzona wielopłaszczyznowa dyskusja uzyskanych wyników na tle wyników innych autorów świadczy o dużej dojrzałości badawczej Pani mgr inż. Anny Palko-Łabuz. Zwraca też uwagę duża wnikliwość i odpowiedzialność Doktorantki przy formułowaniu wniosków. Warto może jednak było, obok podania 17 szczegółowych wniosków cząstkowych, sformułować kilka ogólnych wniosków końcowych podsumowujących bardzo bogate wyniki eksperymentalne uzyskane przez Doktorantkę. Cennym jest również wskazanie przez Autorkę rozprawy perspektyw dalszych badań dotyczących m.in. wpływu badanych flawonoidów i statyn na właściwości błon biologicznych i sygnalizację komórkową zachodzącą z udziałem białek i lipidów błonowych.

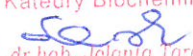
Rozprawa, mimo że porusza złożone zagadnienia dotyczące biologii molekularnej i farmakologii eksperymentalnej nowotworów, a uzyskane przez Doktorantkę wyniki niejednokrotnie nie są łatwe w interpretacji, została zredagowana w sposób bardzo przejrzysty, co znacząco ułatwia jej odbiór. Praca napisana jest poprawnym językiem naukowym, chociaż Autorce nie udało się uniknąć pewnych nieścisłości nomenklaturowych m.in.: i. LoVo/Dx nie jest linią oporną na doksorubicynę tylko sublinią o oporności wielolekowej wyprowadzoną z linii LoVo z zastosowaniem doksorubicyny jako czynnika selekcyjnego; ii. wskazanym jest raczej stosowanie wyrażen „ekspresja/nadekspresja genu” niż „ekspresja/nadekspresja białka”; iii. kaspaza 3 jest proteazą cysteinową, a nie serynową. Mam też kilka drobnych uwag szczegółowych, głównie o charakterze redakcyjnym: i. w podrozdziałach 2.2. „Materiały” i 2.3. „Metody” zalecane jest podawanie polskich nazw stosowanych odczynników; ii. w podrozdziale 2.3. „Metody” część przedstawiającą warunki hodowli komórek nowotworowych LoVo i LoVo/Dx (str. 50) należałoby uzupełnić m.in. o podanie informacji dotyczącej częstotliwości przeszczepiania komórek oraz zaznaczenie, czy komórki LoVo/Dx były hodowane w obecności doksorubicyny jako czynnika selekcyjnego; iii. w pracy zamieszczono wprawdzie krótką informację o tym, że sprawdzono wpływ układów rozpuszczalników na badane procesy i że wszystkie wyniki uzyskane dla flawonoidów i statyn zostały odpowiednio skorygowane o ten efekt, warto byłoby jednak dodać, w jakim zakresie mieściły się wyniki uzyskiwane dla układów rozpuszczalników w badanych zakresach stężeń; iv. na Rys. 27-29 obok wyników otrzymanych dla komórek transfekowanych siRNA anty-*mdr1* należałoby również przedstawić wyniki uzyskane dla komórek transfekowanych kontrolnym siRNA; v. zdanie zamieszczone na str. 136: „W obydwu badanych subliniach komórek nowotworowych potwierdzono obecność genu

CYP3A4” wymaga korekty merytorycznej, gdyż w komórkach linii LoVo i sublinii LoVo/Dx wykazano nie tyle samą obecność genu *CYP3A4*, ile obecność jego mRNA, świadcząca o ekspresji tego genu w badanych komórkach; vi. w pracy można było pominąć zamieszczenie Rys. 15, Rys. 18, Rys. 21 oraz Rys. 30, gdyż struktury badanych flawonoidów i statyn zostały już wcześniej przedstawione na Rys. 12-14, niektóre też treści przedstawione szczegółowo w podrozdziałach 2.2. „Materiały” i 2.3. „Metody” zostały jeszcze raz niepotrzebnie powtórzone w podrozdziale 2.4. „Wyniki”.

Te drobne uwagi wymienione powyżej nie rzutują jednak na moją wysoką ocenę merytoryczną pracy. Chciałabym jednocześnie podkreślić ogromny wkład pracy Doktorantki, o czym świadczy ilość wyników zaprezentowanych w rozprawie.

W podsumowaniu oceny pracy stwierdzam, że jest ona znaczącym osiągnięciem naukowym Doktorantki i jej Promotora zrealizowanym z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych. Przedstawione w rozprawie wyniki, dotyczące mechanizmów molekularnych związanych z wpływem flawonoidów i statyn na komórki raka jelita grubego linii LoVo i jej sublinii o oporności wielolekowej LoVo/Dx, są bardzo wartościowe zarówno pod względem poznawczym, jak również aplikacyjnym i mogą stanowić ważny punkt wyjścia do dalszych badań. Oceniana rozprawa świadczy również o dużej wiedzy Doktorantki w zakresie biologii molekularnej nowotworów, oporności wielolekowej oraz farmakologii eksperymentalnej. Dowodzi także opanowania przez nią bogatego warsztatu metodycznego.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Palko-Łabuz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na wysoki poziom metodyczny i naukowy recenzowanej rozprawy doktorskiej, ogrom włożonej pracy, jak również duże potencjalnie znaczenie aplikacyjne uzyskanych wyników, przedkładam Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie rozprawy.

K I E R O W N I K
Katedry Biochemii

prof. dr hab. Jolanta Tarasiuk