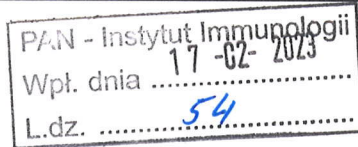




Poznań 10.02.2023



RECENZJA

Pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Cuprych-Belter pt.: „Synteza oraz badanie aktywności biologicznej izotiocyjanianów wobec linii komórkowych raka pęcherza moczowego” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Wietrzyk oraz dr hab. Marcina Sieńczyka w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej Zakładzie Onkologii Doświadczalnej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk oraz w Katedrze Chemii Organicznej i Medycznej Wydziału Chemicznego, Politechniki Wrocławskiej.

Tematyka, która została podjęta w rozprawie doktorskiej Pani mgr Moniki Cuprych-Belter została poświęcona ciągle bardzo aktualnym zagadnieniom poszukiwania nowych strategii terapeutycznych, które mogą zostać użyte w leczeniu chorób nowotworowych. Z uwagi na fakt, że choroby nowotworowe stanowią drugą główną przyczynę śmierci w krajach wysoko rozwiniętych podjęty temat ten wydaje się być szczególnie istotny. W laboratoriach na całym świecie poszukiwane są związki chemiczne umożliwiające uzyskania maksymalnego efektu terapeutycznego przy akceptowalnych dla pacjenta efektach ubocznych. Obecnie największe nadzieje budzą strategie zaprojektowane tak aby selektywnie blokować kluczowe dla przetrwania komórek nowotworowych szlaki przekazywania sygnałów lub szlaki metaboliczne. Takie strategie, precyzyjnie skupione na wybranych celach molekularnych, szlakach sygnałowych lub metabolicznych wydają się być szczególnie interesujące i cenne z punktu widzenia ich zastosowania w klinice co więcej są one również interesujące z punktu widzenia badań podstawowych zmierzających do jeszcze lepszego poznania biologii komórek nowotworowych. W swoich poszukiwaniach Doktorantka przyjrzała się lekom i strategiom terapeutycznym biorącym za cel mechanizmy odpowiedzialne za proliferację komórek nowotworowych ze szczególnym uwzględnieniem izotiocyjanianów oraz prób ich użycia w terapii lekoopornych nowotworów pęcherza moczowego. Pomimo, że w swojej pracy Autorka postanowiła posłużyć się, jako modelem hodowlami in vitro to wydaje się, że tak dobrze przemyślana analiza modulacji

wewnątrzkomórkowych szklaków związanych z regulacją proliferacji komórek nowotworowych z wysokim prawdopodobieństwem może okazać się skuteczna również w warunkach *in vivo*.

Dysertacja ma typowy układ, rozpoczyna się od streszczenia w wersji polskiej i angielskiej, wykazu skrótów, spisu treści, wstępu, i celu pracy, opisu użytych materiałów i zastosowanych metod, omówienia wyników, dyskusji, wniosków, piśmiennictwa wykazu rycin i tabel oraz bibliografii. Na końcu pracy można zapoznać się z dotychczasowym dorobkiem naukowym Autorki, który na tym etapie rozwoju kariery można uznać za obiecujący biorąc pod uwagę, że w latach 2019-2021 została Ona współautorką czterech prac opublikowanych w prestiżowych czasopismach naukowych znajdujących się na liście Journal Citation Reports.

Wstęp

W bardzo obszernym, liczącym około 50 stron wstępie Autorka przybliży czytelnikowi większość zagadnień niezbędnych do zrozumienia zagadnień poruszanych w pracy. W tym rozdziale Autorka przedstawiła w przystępny sposób podstawowe aspekty związane z epidemiologią raka pęcherza moczowego, przedstawiła również czynniki ryzyka oraz podstawowe strategie używane w diagnostyce tego nowotworu. W dalszej części czytelnik może zapoznać się z opartym na klasyfikacji histologicznej podziałem nowotworów pęcherza moczowego i poznać charakterystyczne cechy molekularne komórek raka pęcherza moczowego. Opisane są również podziały oparte na wygląd komórek i głębokość ich naciekania oraz ocena stopnia zróżnicowania oraz zaawansowania raka pęcherza moczowego. Przedstawiona została klasyfikacja molekularna raka pęcherza moczowego w tym markery molekularne raka pęcherza moczowego. W kolejnej części wstępu opisane są obecnie stosowane sposoby leczenia nowotworów pęcherza moczowego w tym sposoby leczenia chorych na ich formy nieprzerzutujące i przerzutujące. W następnej części opisano zagadnienia związane z opornością komórek nowotworowych na najczęściej stosowane terapeutyki a więc cisplatynę, gemcytabinę, alkaloidy vinca, doksorubicynę i metotreksat. W końcowej części Autorka przybliżyła czytelnikowi będące przedmiotem Jej rozprawy izotiocyjaniany opisując te związki pod kątem ich występowania, właściwości oraz działania przeciwnowotworowego ze szczególnym uwzględnieniem ich wpływu na cykl komórkowy, indukcje apoptozy, autofagii, stresu oksydacyjnego a także właściwości antyangiogenne i wpływające na procesy związane z tworzeniem przerzutów nowotworowych. W jednym z ostatnich rozdziałów Autorka opisała produkty obecne w diecie człowieka, w których możemy znaleźć szczególnie wysoką zawartość izotiocyjanianów warzyw z rodziny krzyżowych (Cruciferae) stanowiące bogate źródło izotiocyjanianów w diecie człowieka.

99

Cel pracy

W tym rozdziale Autorka sprecyzowała 3 cele wokół których skupiły się Jej badania, a więc wyprowadzenie lekoopornych komórek nowotworów pęcherza moczowego, zsyntezowanie biblioteki strukturalne zróżnicowanych izotiocyjanianów oraz zbadanie ich aktywności biologicznej w modelu hodowli komórek pęcherza moczowego w tym wyprowadzonych linii opornych na działanie chemioterapeutyków.

Metodyka

Metodyka badań jest bardzo dobrze opisana i z pewnością może być pomocna dla każdego, kto chciałby przeprowadzić podobne doświadczenia, ponieważ podane są tu chyba wszystkie niezbędne detale metodyczne. Na uwagę zasługuje szeroki wachlarz linii komórkowych w tym linii opornych na wybrane chemioterapeutyki. Warto podkreślić, że procedura uzyskania tych linii została w tym rozdziale opisana z niezbędnymi do jej wykonania szczegółami. Na uwagę zasługują też oznaczenia ekspresji genów i poziomu wybranych białek związanych z lekoopornością w panelu linii lekoopornych oraz ich wrażliwych odpowiedników pochodzących z raka pęcherza moczowego za pomocą odpowiednio techniki RT-PCR i Western blot. Szczególną uwagę Autorka poświęciła oznaczeniu stężenia glutationu zarówno formy utlenionej jak i zredukowanej w komórkach linii lekoopornych oraz wrażliwych raka pęcherza moczowego. Szczegółowo opisano również syntezę nowych izotiocyjanianów oraz badanie ich aktywności biologicznej wobec komórek wybranych linii raka pęcherza moczowego w tym wpływu tych związków na zdolność do tworzenia kolonii oraz na aktywność kaspaz 3/7. Ponadto oceniono indukcję apoptozy za pomocą testu z Aneksyną V i jodkiem, propidyny, podobnie jodek propidyny posłużył do oceny wpływu badanych związków na cykl komórkowy. Ponadto autorka przebadala wpływ inkubacji z badanymi związkami na polimeryzację tubulin w badanych komórkach nowotworowych.

Wyniki

Opis wyników rozpoczyna się od zaprezentowania wyprowadzonych przez Autorkę linii komórkowych raka pęcherza moczowego UM-UC-3 odpornej na cisplatynę winblastynę, gemcytabinę i cisplatynę. Na uwagę zasługuje szczegółowo przygotowana charakterystyka lekoopornych oraz wrażliwych linii komórkowych raka pęcherza moczowego w tym ocena rozwoju ich oporności krzyżowej na chemioterapeutyki o zróżnicowanym mechanizmie działania. Bardzo ciekawie zapowiadała się również analiza ekspresji wybranych genów i poziomu wybranych białek w lizatach komórkowych, niestety forma prezentacji wyników znacznie utrudnia porównanie wyników między sobą. Wykresy są zdecydowanie za małe, a podpisy mało czytelne, i jak się można

gm

przekonać czytając dalej ten rozdział jest to przypadłość charakteryzująca całą część prezentującą wyniki w tej pracy ponieważ ten sam zarzut można sformułować, w przypadku wyników przedstawiających analizę stosunku glutationu zredukowanego do utlenionego oraz ilości glutationu całkowitego w badanych komórkach linii wyjściowych oraz lekoopornych. W dalszej części opisu wyników autorka przedstawiała zsyntetyzowane izotiocyjaniany oraz ich skróconą charakterystykę. Tabelka przedstawiająca wzory chemiczne badanych związków pozwala na szybką orientację w zakresie badanych struktur natomiast tabela prezentująca wstępną ocenę aktywności biologicznej zsyntezowanych izotiocyjanianów wobec panelu linii komórkowych raka pęcherza moczowego zwraca uwagę swoją raczej nietypową konstrukcją prezentującą nie tylko IC50 ale także 95% przedział ufności. Dalej czytelnik może zapoznać się z wpływem wybranych związków na podstawowe parametry związane z procesami śmierci lub przetrwania komórek po traktowaniu testowanymi izotiocyjanianami takimi jak aktywności kaspaz 3/7, proporcje komórek apoptotycznych do nekrotycznych oraz żywych po traktowaniu izotiocyjanianami, analiza wpływu działania izotiocyjanianów na cykl komórkowy wpływ działania izotiocyjanianów na właściwości klonogenne komórek raka pęcherza moczowego jak również porównanie stosunku glutationu zredukowanego i utlenionego w komórkach raka pęcherza moczowego po traktowaniu izotiocyjanianami. Wpływ na podziały komórkowe zbadany został także przez pryzmat oceny polimeryzacji tubulin w obecności wyselekcjonowanych najbardziej aktywnych izotiocyjanianów. Całość sekcji wyników zamykają analiza poziomu wybranych białek w lizatach komórkowych po traktowaniu izotiocyjanianami oraz obrazy mikroskopowe komórek linii raka pęcherza moczowego po traktowaniu badanymi związkami. Lektura tej sekcji jest doskonałym świadectwem ogromu pracy jakie Autorka włożyła w badania w laboratorium, szkoda więc, że nie zdołała ich odpowiednio zaprezentować zwłaszcza dysponując takim programem jak GraphPad Prism 7.0 umożliwiającym naprawdę doskonałą prezentację wyników. Tymczasem wykresy zaprezentowane przez Autorkę są zbyt małe a podpisy słabo czytelne. Być może jest to częściowa wina konwersji do formatu pdf podczas której niektóre programy nie radzą sobie z osadzonymi obiektami z programu GP Prism. Przy tej okazji nadmienić należy, że stosunkowo często również nie do końca doskonale są podpisy pod rycinami. Podpisy te nie przedstawiają wszystkich informacji które chciałby tam znaleźć czytelnik np. rycina 27 czytelnik który nie zagłębi się w tekst pracy nie dowie się z podpisu ryciny co znaczy FITC-A oraz PI-A. Uważam też, że zastosowane wyśrodkowane wyrównywanie tekstu w podpisach rycin znacznie utrudnia ich czytanie. Dobrze byłoby również przedstawić zdjęcia z testu tworzenia kolonii, kształt kolonii, a nie tylko ich liczba potrafi też sporo powiedzieć o naturze komórek i zahamowaniu ich proliferacji. Więcej uwagi Autorka mogłaby również poświęcić ujednoliceniu skali wykresów co również w wielu przypadkach jest bardzo pomocne dla

czytelnika. Gwiazdki oznaczające różnice statystycznie istotne też mogłyby być nieco staranniej umiejscowione GP Prism posiada specjalne zaimplantowane to tego celu narzędzia. Bardzo ciekawe są zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego szkoda jednak, że słabo widoczne są zmiany na które Autorka wskazała za pomocą odpowiednich strzałek, tutaj również można było dopracować formę prezentacji. Wszystkie te uwagi mają jednak charakter edytorski i nie umniejszają wartości pracy.

Dyskusja

W rozdziale liczącym niespełna 18 stron Autorka konfrontuje wyniki przeprowadzonych przez siebie eksperymentów z danymi literaturowymi w kontekście zarówno mechanizmów molekularnych leżących u podłoża lekooporności komórek nowotworowych jak wpływu jaki wywierają na nie izotiocyaniany ze szczególnym uwzględnieniem kluczowych w tej pracy aspektów jak profil oporności krzyżowej na związki o zróżnicowanym mechanizmie działania, miany w ekspresji genów związanych z fenotypem lekooporności, poziom białek związanych z lekoopornością, zmiany w ilości glutationu całkowitego oraz zmiany w stosunku poziomów glutationu w formie zredukowanej i utlenionej. Szczególnie interesujący wydaje się fragment dotyczący wzajemnej integracji białek warunkujących lekooporność oraz wpływu badanych izotiocyanianów na procesy związane z indukcją apoptozy i zmianami we frakcjach komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Autorka umiejętnie prowadzi narrację bardzo trafnie cytując odnośniki literaturowe. Być może przydatne okazałaby się tutaj schematy obrazujące wzajemny wpływ białek warunkujących lekooporność badanych związków na mechanizmy zachodzące w komórkach i decydujące o ich śmierci lub przetrwaniu. Bardzo ciekawy mógłby być również schemat porównujący ekspresję genów i poziom odpowiadających im białek, pokazujący wzajemne relacje tych dwóch czynników w badanych komórkach nowotworów pęcherza moczowego.

Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników Autorka formułuje cztery wnioski dotyczące zarówno mechanizmów lekooporności komórek pęcherza moczowego, w tym zmian w ekspresji genów warunkujących oporność krzyżową jak i zależność aktywności zsyntezowanych izotiocyanianów od ich budowy, ze szczególnym uwzględnieniem długości łańcucha alifatycznego grupy estrowej. We wnioskach Autorka powiązała również wpływ badanych izotiocyanianów na zaburzenia polimeryzacji tubulin i wskazała na ich konsekwencje za które uznała nieprawidłowości w tworzeniu wrzeciona podziałowego, błędy podczas podziału mitotycznego, i śmierć komórki na

skutek apoptozy, która jest w dużej mierze skutkiem zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2/M. Autorka we wnioskach wskazuje jako kluczowe aspekty działania badanych izotiocyjanianów podwyższony poziom białka p21 oraz obniżenie poziomu α -tubuliny i β -tubuliny obniżenie potencjału klonogennego oraz zmniejszoną pulę glutationu dostępnego w komórkach. Pomimo, że Autorka nie wspomniała tutaj o zmianach w stosunku glutationu zredukowanego i utlenionego w komórkach raka pęcherza moczowego po traktowaniu badanymi izotiocyjanianami jestem zdania, że sformułowane przez Autorkę wnioski doskonale podsumowaną zaobserwowane w pracy kluczowe z punktu widzenia wybiórczej eliminacji komórek nowotworowych zmiany w ich parametrach biochemicznych.

Piśmiennictwo,

Pracę zamyka lista piśmiennictwa zawierająca 276 pozycji. Piśmiennictwo jest w większości przypadków dobrze dobrane, i w większości aktualne. W pracy cytowane głównie publikacje anglojęzyczne ale również w spisie cytowań można znaleźć polskie pozycje, te ostatnie jednak nie posiadają informacji z jakiego czasopisma pochodzą. Cytowane są również strony internetowe i pomimo, że podane jest data wejście na stronę to strony z serwisów internetowych mogą ulegać zmianom tak więc moim zdaniem powinno się unikać ich cytowania i właściwie cytować tylko w ostateczności, jako linki do stron internetowych można moim zdaniem cytować jedynie linki do publikacji w czasopismach naukowych w formacie „open access” bo ich zawartość prawdopodobnie zawsze zostanie takie sama. Każdym razem już na pewno należy unikać zamieszczania niezwykle długich linków do wyników wyszukiwania grafiki w sersie Google. Taki link jest z uwagi na swoją długość niemalże niemożliwy do wpisania w przeglądarkę w przypadku kiedy czytelnik posługuje się papierową wersją pracy. Ponadto wyniki wyszukiwania z dużym prawdopodobieństwem będą się różniły od wyników na które powołuje się Autorka. Nie należy moim zdaniem w takich opracowaniach jak rozprawa doktorska cytować Wikipedii, której twórcy w Warunkach Użytkowania sami przyznają „Nie odpowiadamy za fachową poprawność - nasze zasoby udostępniamy tylko w celach informacyjnych”.

Aspekty formalne i edytorskie

Pod tym względem podobnie jak pod względem merytorycznym pomimo naprawdę bardzo znacznej objętości praca jest dobrze przygotowana. W tekście można doszukać się jedynie pojedynczych literówek, brak jest praktycznie błędów stylistycznych, niefortunnych przekładów z języka angielskiego, czy określeń, żargonowych. Tak jak wspomniano powyżej Autorka mogła nieco staranniejszym przygotowaniem wykresy obrazujące obserwowane zmiany zarówno ekspresji genów,

poziomie białek czy zmiany innych kluczowych parametrów. To zdecydowanie polepszyłyby odbiór dysertacji przez czytelnika i zrozumienie opisywanych procesów. Również co podkreślono powyżej zdecydowanie Autorka powinna unikać cytowania stron internetowych w tym informacji z Wikipedii, a już na pewno nie powinna cytować wyników wyszukiwania grafiki Google. Również tak jak to wspomniano powyżej z w pracy zabrakło moim zdaniem schematów ilustrujących obserwowane zmiany.

W podsumowaniu, biorąc pod uwagę przedstawione powyżej argumenty uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi kompleksowe rozwiązanie postawionego przez Doktorantkę problemu badawczego i świadczy o dojrzałości naukowej Pani mgr Moniki Cuprych-Belter. W pracy zostały podjęte bardzo istotne problemy zarówno z punktu widzenia terapii chorób nowotworowych jak i z punktu widzenia rozwoju nauk podstawowych. Spełniając wymóg stawiany przed tego rodzaju recenzjami z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia ustawowe warunki stawiane rozprawom doktorskim wnoszę, zatem wniosek do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu dopuszczenie Pani mgr Moniki Cuprych-Belter do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Katedry i Zakładu Toksykologii
Uniwersytetu Medycznego

Prof. dr hab. Marek Murias