

KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b; tel. +48 81448 7400; e-mail: jaroslaw.dudka@umlub.pl

Prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka

Lublin, dnia 17 marca 2021 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr farmacji **Katarzyny Papierskiej**,

pt. **„Poszukiwanie naturalnych i syntetycznych modulatorów ścieżek sygnałowych *Nrf2*, *NF-κB* oraz *STAT3*”**, napisanej w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Promotorem pracy jest **dr hab. Violetta Krajka-Kuźniak**.

Głównym celem rozprawy doktorskiej była analiza wyników badań nad poszukiwaniem związków o równoczesnej aktywności na trzy szlaki sygnałowe, regulowane przez *Nrf2*, *NF-κB* oraz *STAT3* w komórkach linii raka jelita grubego, których żywotność badane związki obniżają o 30%.

Nowotwory stanowią główną przyczynę zgonów na świecie. Z tego względu badania nad zmniejszeniem zachorowań oraz skuteczną terapią przeciwnowotworową pochłaniają ogromne środki. O ile w diagnostyce nowotworów – w celu ich wczesnego wykrywania, klasyfikowania oraz monitorowania terapii dokonał się olbrzymi postęp technologiczny i poznawczy, o tyle w samej farmakoterapii, mimo wielu sukcesów, wciąż trudno uzyskać zadawalający postęp. Od około 30 lat terapia cytostatykami jest uzupełniana lub zastępowana przez terapię celowaną. Mimo, że leki terapii celowanej są mniej toksyczne niż klasyczne cytostatyki i dają w wielu przypadkach lepszy wskaźnik wyleczeń, to nierzadko obserwuje się rozwój oporności i nawrót choroby. Ponadto nowoczesne leki do immunoterapii i terapii celowanej wielu nowotworów są bardzo drogie i mogą stanowić problem medyczny i społeczny ze względu na barierę ekonomiczną. Zachodzi zatem potrzeba równoległego kontynuowania poszukiwań nowych chemioterapeutyków o dużej selektywności działania, Z tego względu temat pracy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Papierskiej należy uznać za wciąż aktualny i wartościowy.

Oceniana rozprawa została przygotowana zgodnie z zasadami przyjętymi dla tego typu opracowań. Praca zredagowana jest bardzo dobrze, w logiczny, jasny i merytorycznie poprawny sposób, napisana jest z dużą precyzją słowa i dbałością o szczegóły. Czyta się ją z lekkością. Pozwala to na stwierdzenie, że Autorka jest osobą bardzo skrupulatną i dokładną w swoich

KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b; tel. +48 81448 7400; e-mail: jaroslaw.dudka@umlub.pl

działaniach, co jest bardzo pożądane przy przeprowadzeniu tytu i takich badań, jakie wykonała w ramach pracy doktorskiej.

Tytuł rozprawy jest ogólny, lecz poprawny i adekwatny do celu pracy i zakresu przeprowadzonych badań. Wydaje się, że mógłby być jeszcze uzupełniony o informację, że badania odnoszą się do komórek raka jelita grubego.

Wstęp stanowi wprowadzenie do tematyki podjętych badań, nie zawiera jednak założeń pracy i krótkiego wprowadzenia w tematykę. Autorka przedstawiła założenia we wspólnym rozdziale z celem badań. Stąd, na pierwszej stronie wstępu czytelnik od razu napotyka rozdział traktujący o epidemiologii raka jelita grubego bez ukierunkowania go na tematykę podjętych badań. Wstęp liczący 41 stron może się wydawać zbyt długi, stanowi jednak spójną całość i trudno wskazać, z których części można by było zrezygnować. Autorka opisała problematykę ściśle związaną z postawioną hipotezą badawczą. Obszerność części teoretycznej uzasadniona jest szerokim spektrum poruszanych zagadnień. Autorka opisała bowiem epidemiologię, czynniki ryzyka, patogenezę i leki stosowane obecnie w terapii raka jelita grubego, które przemawiają o aktualności problemu i potrzebie poszukiwania nowych bardziej skutecznych sposobów jego leczenia. Najwięcej uwagi Doktorantka słusznie poświęciła na charakterystykę ścieżek sygnałowych i ich roli w patogenezie raka jelita grubego, co pozwala czytelnikowi na ocenę poprawności planowania i zrealizowania badań do osiągnięcia postawionego celu. Rozdział ten kończy charakterystyka związków pochodzenia naturalnego i syntetycznego, których wpływ na opisane wcześniej szlaki sygnałowe i cytotoksyczność stał się przedmiotem badań Doktorantki. We Wstępie została opisana problematyka ściśle związana z postawioną hipotezą badawczą przedstawioną w dalszej części pracy. W rozdziale tym Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością zagadnień związanych z rakiem jelita grubego szczególnie w obszarze regulacji genetycznej molekularnych szlaków sygnałowych odpowiedzialnych głównie za proliferację, której zaburzenie zależne od mutacji stanowi istotę każdego procesu nowotworowego.

W następnym rozdziale, gdzie Autorka buduje fundamenty założeń pracy, zabrakło odniesień literaturowych, które byłyby pomocne w ocenie ich istotności. Można doszukać się ich w innych rozdziałach, ale odnalezienie ich stanowi pewną trudność dla oceniającego.

Autorka poprawnie formułuje cel w oparciu o ciekawe założenie badawcze – możliwość powiązania skuteczności przeciwnowotworowej z jednoczesną deregulacją ścieżek sygnałowych

KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b; tel. +48 81448 7400; e-mail: jaroslaw.dudka@umlub.pl

Nrf2, NF- κ B i STAT3. Jak dowiadujemy się z kolejnego rozdziału, dla ujednoczenia warunków badań wszystkie testowane związki zostały użyte w stężeniu, które prowadzą do zmniejszenia o 30% żywotności badanych hodowli komórek nowotworowych.

Autorka bardzo starannie zaplanowała opisała i wykonała doświadczalną część pracy. Metody zostały opisane w sposób merytorycznie poprawny i precyzyjny, co pozwala na powtórzenie badań w innych laboratoriach. W ocenie metodyki recenzent musi odpowiedzieć przede wszystkim na pytanie, czy skonstruowany przez Autorkę model badawczy rozwiąże problem zdefiniowany celem badań. Odpowiedź na to pytanie jest pozytywna. Warto jednak poddać dyskusji pewne kwestie, które mogły by podnieść rangę przeprowadzonych badań. Autorka nie podała jaki efekt wywołują badane związki na komórki prawidłowe przy stężeniach, które wywołują 30% spadek żywotności w komórkach rakowych. Jeżeli cytotoksyczność jest większa dla komórek prawidłowych niż nowotworowych, czy warto podejmować kolejne badania? Wydaje się, że informacje, co do liczby powtórzeń oznaczeń nie są pełne. Autorka podaje, że wyniki są średnią z trzech oddzielnych eksperymentów. Zapewne wykonywała jeszcze tzw. powtórzenia robocze (powtórzenia samego oznaczenia). W przeciwnym razie nie byłoby możliwe aby program statystyczny przeprowadził analizę testu parametrycznego t-Studenta na trzech oznaczeniach w jednej grupie; W jakim celu wykonywano próbę ślepa (str. 61)? Czy zastosowane przeciwciała są przeciw ludzkiemu białku (str. 64)? – brak numeru katalogowego uniemożliwia weryfikację tego ważnego wyboru; Jeżeli próbie kontrolnej przypisano stałą wartość „1” dla poziomu ekspresji, to jak wyliczano wartość SEM (str. 71)? Badania cytotoksyczności przeprowadzone jedynie testem MTT są orientacyjne. Warto dla związków o największej aktywności przeprowadzić badania mikroskopowe i/lub zastosować dodatkowy test cytotoksyczności o innym mechanizmie działania.

Wyniki badań Doktorantka opisała na 54 stronach, dzieląc je na dwie części. W pierwszej opisuje efekt działania wtórnych metabolitów porostów, a w drugiej wybranych związków syntetycznych. Opis jest klarowny, wyczerpujący odnosi się do najważniejszych kwestii stanowiących postawiony problem badawczy. Ryciny są czytelne, a ich układ dobrze przemyślany. Część z nich równocześnie prezentuje wyniki ekspresji genu i stężenie białka dla tego samego parametru. W jednym miejscu (str. 77) Autorka określa mianem „znaczący mniejszy wpływ” w odniesieniu do



KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b; tel. +48 81448 7400; e-mail: jaroslaw.dudka@umlub.pl

poziomu p-Nrf2 w komórkach HVT116, mimo, że nie znajduje to potwierdzenia w istotności statystycznej.

Rozdział Dyskusja mimo dużej ilości uzyskanych wyników jest napisany zwięźle, jasno i stanowi zwartą, logiczną całość, co wskazuje na zdolność syntetycznego ujęcia problemu. Z drobnych uwag – Autorka w różnych rozdziałach pracy używa terminu „homeostaza” w odniesieniu do szlaków sygnałowych czy komórki. W ostatnich latach obserwuję używanie tego terminu jako synonim równowagi w wybranych procesach chemicznych, czy komórce. Jednak wolę jak termin ten jest zarezerwowany dla bardziej złożonych procesów pozostających ze sobą w synchronizacji i równowadze – np. homeostaza w „organizmie wyższym”.

Wnioski są napisane w sposób logiczny, w ścisłym powiązaniu z otrzymanymi wynikami badań i odzwierciedlają postawione cele badawcze. W rozdziale „Podsumowanie i Wnioski” (str. 134) chciałbym zwrócić uwagę na kilka sformułowań, które nie są zbyt precyzyjne:

1. Właściwie w rozdziale tym brakuje „podsumowania”;
2. „Przeprowadzone badania pozwoliły na następujące stwierdzenia” – raczej nie stwierdzenia tylko wnioski;
3. „Spośród badanych wtórnych metabolitów porostów największą aktywność wykazują Fyz i Salaz (stwierdzenie nr.1), – o jaką aktywność chodzi, czy hamowania szlaków sygnałowych, czy redukcji żywotności w teście MTT?
4. „Zwiększona aktywacja Nrf2-ARE pod wpływem Fyz i Salaz prowadzi do zwiększonej ekspresji genów *SOD* i *GSTP* i jednocześnie zmniejsza ekspresję docelowych genów NF- κ B *COX-2* i *iNOS* oraz *STAT3* *Bcl-xl* i *c-Myc*.” (stwierdzenie nr 3). – w tego typu eksperymencie możemy mówić że badany związek wpływał, zmieniał, zmniejszał, zwiększał badany parametr. Nie można jednak pisać we wnioskach, że zmieniony w wyniku działania badanej substancji jakiś czynnik zmieniał drugi – bo to nie było badane w tej pracy.

Podobną nadinterpretację można spotkać w kilku miejscach dyskusji:

- „Efektem aktywacji Nrf2 przez najbardziej aktywne związki badane w tej pracy była zwiększona ekspresja genów *SOD* i *GSTP*.” – str. 129;
- „Obniżona aktywacja NF- κ B pod wpływem metabolitów porostów Fyz i Salaz skutkowała zmniejszeniem ekspresji genów *COX2* i *iNOS*...” – str. 130.
- „Metabolity porostów.....zmniejszały poziom białka p-STAT3 w jądrze komórkowym, czego konsekwencją było obniżenie ekspresji antyapoptotycznego białka *Bcl-xl* i *c-Myc*. – str. 131.



KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b; tel. +48 81448 7400; e-mail: jaroslaw.dudka@umlub.pl


Mimo, iż te powiązania opisywano w niektórych komórkach nowotworowych i powiązanie przyczynowo skutkowe wydaje się prawdopodobne, to nie jesteśmy uprawnieni do wyciągania takich wniosków jeżeli takie powiązania w pracy własnej nie były badane.

W rozdziale „Piśmiennictwo” znajduje się 175 pozycji poprawnie dobranych, a znacząca część pochodzi z ostatnich 10 lat, co wskazuje, że Doktorantka oparła się na aktualnym stanie wiedzy.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Papierskiej stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego nie tylko o dużej wartości poznawczej ale również o potencjale aplikacyjnym. Autorka we Wstępie do pracy wykazała iż posiada zdolność klarownego opisu skomplikowanych zagadnień w sposób syntetyczny. Autorka swobodnie porusza się w technikach badawczych z zakresu genetyki, biologii molekularnej i biochemii, a opis metodyki, a później interpretacja wyników i dyskusja pozwalają stwierdzić, że czuje się w tej tematyce swobodnie, rozumie ją i potrafi w jasny i logiczny sposób przekazać swoją wiedzę czytelnikowi.

Biorąc powyższe pod uwagę, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jak również wnosi istotne aspekty nowości w ramach rozwoju dziedziny nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki farmaceutyczne i tym samym spełnia wymogi stawiane 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 tego względu przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu wnioski o dopuszczenie mgr Katarzyny Papierskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Toksykologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Prof. dr hab. Jarosław Dudka