

**Ocena**  
**rozprawy doktorskiej mgr Barbary Bukowskiej pt.:**  
**„Molekularne mechanizmy interakcji WP 631 i epotilonu B w komórkach raka**  
**jajnika”.**

Zgodnie z danymi Krajowego Rejestru Nowotworów (KRN) wśród nowotworów złośliwych narządów płciowych kobiet rak jajnika stanowił drugą przyczynę zachorowań oraz czwartą przyczynę zgonów wśród wszystkich nowotworów złośliwych występujących u kobiet.

Niecharakterystyczne objawy we wczesnym stadium rozwoju raka jajnika utrudniają wczesne postawienie diagnozy i szybkie wdrożenie terapii. Najczęściej chore na raka jajnika trafiają do leczenia w stadiach znacznego zaawansowania, z objawami masy guza w miednicy mniejszej. Należy zwrócić szczególną uwagę, że rak jajnika jest najgorzej rokującym nowotworem ginekologicznym, o najniższym poziomie 5 – letniego przeżycia, co wynika z zaawansowania choroby w momencie rozpoznania (prawie w 70% przypadków nowotwór ten rozpoznaje się w III i IV stopniu zaawansowania). Pomimo coraz większej wiedzy o mechanizmach rozwoju i klinicznym przebiegu raka jajnika, a także ciągłego doskonalenia metod diagnostycznych, wczesne wykrywanie choroby oraz monitorowanie leczenia jest wciąż wysoce niezadowolające.

Podstawą leczenia pierwotnego jest postępowanie skojarzone, które obejmuje leczenie chirurgiczne i chemioterapię. Wskazania do systemowej chemioterapii zależą od stopnia zaawansowania, jakości leczenia chirurgicznego oraz stopnia złośliwości histologicznej. Odstąpienie od pooperacyjnej chemioterapii jest tylko możliwe w tzw grupie dobrego rokowania (w stopniu IA lub IB G1). Spośród chemioterapeutyków najczęściej stosowane są pochodne platyny i taksoidu. Jednak część chorych jest oporna na leczenie pochodnymi platyny (platynoniewrażliwość, platynooporność) co istotnie pogarsza rokowania, dlatego istotne jest poszukiwanie nowych, efektywnych metod terapeutycznych.

W ten interesujący nurt badań włączona jest rozprawa doktorska mgr Barbary Bukowskiej.

Rozprawę doktorską stanowi cykl spójnych tematycznie prac (5 prac, w tym 3 prace oryginalne o charakterze eksperymentalnym i 2 prace przeglądowe). Jest to zgodne z obowiązującymi aktami prawnymi: Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 3 października 2014 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

W rozprawie doktorskiej uwzględniono następujące prace:

1. **Bukowska B.**, Gajek A., Marczak A. *Two drugs are better than one. A short history of combined therapy of ovarian cancer*. *Contemp Oncol (Pozn)* 2015, 19(5): 350–353.
2. Marczak A., **Bukowska B.**, Rogalska A. *WP 631 and Epo B synergize in SKOV-3 human ovarian cancer cells*. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014, 37(1): 256–266.
3. Rogalska A., **Bukowska B.**, Marczak A. *Caspases and ROS-dependent mechanism of action mediated by combination of WP 631 and epothilone B*. *Anticancer Agents Med Chem* 2014, 14(9): 1261–1270.
4. **Bukowska B.**, Rogalska A., Forma E., Bryś M., Marczak A. *Why a combination of WP 631 and Epo B is an improvement on the drugs singly. Involvement in the cell cycle and mitotic slippage*. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016, 17(3): 1299–308.
5. **Bukowska B.**, Rogalska A., Marczak A. *New potential chemotherapy for ovarian cancer – Combined therapy with WP 631 and epothilone B*. *Life Sci* 2016, 151: 86–92.

Oprócz spisu oraz kopii wymienionych powyżej publikacji, Doktorantka w rozprawie załączyła także obszernie omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników z odnośnikami do poszczególnych publikacji oznaczonych w spisie numerami I-V, dwustronicowe streszczenie w języku polskim i angielskim, pozostały dorobek naukowy, a także oświadczenia współautorów prac na temat udziału w ich powstawaniu.

Prace wchodzące w zakres rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w latach 2014-2016, w języku angielskim, w czasopismach o charakterze medycznym ukierunkowanych na tematykę onkologiczną, takich jak *Contemporary Oncology*, *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* lub farmakologicznych, jak *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Ostatnia z prac o charakterze przeglądowym ukazała się w czasopiśmie *Life Science*. Sumaryczna wartość współczynnika *Impact Factor* publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi **9,77 (114 punktów MNiSW)**. Artykuły te są wprawdzie wieloautorskie, jednakże załączone oświadczenia współautorów jednoznacznie wskazują na duży udział Doktorantki w ich powstawaniu i świadczą, że zdobyła Ona doświadczenie nie tylko w prowadzeniu prac eksperymentalnych i analizowaniu wyników, ale także w zakresie formułowania koncepcji pracy, pisania manuskryptów i prowadzenia korespondencji z wydawnictwem.

Celem pracy była ocena skuteczności stosowania dwóch związków podawanych łącznie: WP 631 i epotilonu B (Epo B) w komórkach linii raka jajnika SKOV-3 oraz poznanie mechanizmu skojarzonego działania tych związków. Cel ten realizowano poprzez określenie cytotoksyczności, genotoksyczności i zdolności do generowania ROS. Szczególną uwagę

zwrócono na procesy apoptozy zachodzące w komórkach oraz przebieg cyklu komórkowego. Do zrealizowania swoich celów badawczych zastosowała wiele nowoczesnych technik fizykochemicznych, w tym mikroskopię fluorescencyjną, cytometrię przepływową, metody spektrofluorymetryczne, spektrofotometryczne, pomiary RT-PCR, a także opanowała techniki prowadzenia hodowli komórkowych w warunkach sterylnych.

Zaproponowana przez Doktorantkę kolejność prac bardzo ułatwia analizę. Dodatkowo Doktorantka w swoim obszernym wprowadzeniu, prowadzi czytelnika poprzez swoje publikacje, wyjaśniając przyczyny, dla których podjęto tego typu badania, określając cel, a także wskazując, w których pracach poszczególne elementy celu pracy zostały zrealizowane.

Cykl rozpoczyna się artykułem o charakterze przeglądowym, w którym Doktorantka uzasadnia wybór tematyki podjętej w pracy doktorskiej. Poprzez przegląd doniesień literaturowych na temat stosowania chemioterapii w leczeniu raka jajnika w ujęciu historycznym, pokazuje iż terapia skojarzona, którą stosuje się od wielu lat jest najskuteczniejszą formą chemioterapii. Warto ją więc stosować, ale należy proponować nowe leki w celu zwiększenia skuteczności leczenia. Tutaj także pojawia się zestawienie rodzajów współdziałania związków podawanych łącznie, a także omówienie teoretycznych podstaw analizy izoblograficznej służącej ocenie typu interakcji między lekami. Można więc powiedzieć iż publikacja ta jest odpowiednikiem części teoretycznej rozprawy doktorskiej pisanej w postaci manuskryptu. Po niej następuje właściwa część pracy, w której Autorka w trzech publikacjach eksperymentalnych przedstawia zastosowane metody oraz wyniki swojej rozprawy doktorskiej. W pracy nr [II] dokonano analizy typu interakcji występującej między WP 631 a Epo B w badanych komórkach raka jajnika SKOV-3. Wykazano, że ma miejsce synergizm działania. Dla wybranych stężeń wykazano także, iż kombinacja związków cechuje się znacznie silniejszymi właściwościami proapoptotycznymi niż badane związki zastosowane pojedynczo. Ponadto uszkodzenia DNA indukowane przez kombinację WP 631 i Epo B, oceniane w teście TUNEL, były znacznie wyższe niż te generowane przez poszczególne związki. Badania nad aktywnością kombinacji związków kontynuowano w kolejnej pracy [III], gdzie pojawiły się wyniki zmian potencjału błony mitochondrialnej, aktywności kaspaz, a także oznaczenia ilości reaktywnych form tlenu oraz uszkodzeń DNA. Ostatnia praca eksperymentalna [IV] zawiera szczegółową analizę cyklu komórkowego komórek linii SKOV-3 wraz z oceną udziału białek regulujących ten cykl w aktywności WP 631 i EpoB stosowanych łącznie. Białka te zostały dobrane na podstawie doniesień literaturowych i obejmują cztery proteiny, na których aktywność wpływają WP 631

i Epo B stosowane pojedynczo: cyklina B i cyklinozależna kinaza 1 (CDK1) odpowiedzialne za przejście z fazy G2 do M cyklu komórkowego, białko EpCAM wpływające na aktywność cyklin A, D i E oraz białko HMGB1 kontrolujące cykliny D i E. Badania zostały wykonane zarówno z wykorzystaniem inhibitorów tych białek, po zastosowaniu których oceniano zmiany w przebiegu cyklu komórkowego, jak i na poziomie mRNA z wykorzystaniem technik RT-PCR. Ostatnia z prac [V] ma charakter przeglądu i może być uznana za odpowiednik dyskusji w typowej rozprawie doktorskiej. Dokonano w niej zestawienia aktualnego stanu wiedzy dotyczącego kombinacji WP 631 i Epo B i jej potencjalnego wykorzystania w terapii raka jajnika. Wskazano zarówno korzyści, jak i potencjalne zagrożenia tego typu rozwiązań. W artykule oparto się na wynikach z prac wchodzących w skład rozprawy i przedyskutowano je z doniesieniami literaturowymi z ostatnich lat. Graficzne podsumowanie istotnie wzbogaca przedstawione sprawozdanie.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka formułuje cztery poprawne wnioski odpowiadające na zadania badawcze postawione w celu pracy:

1. WP 631 i Epo B działają synergistycznie w komórkach raka jajnika, anajefektywniejszym połączeniem jest to, w którym stosunek molowy związków wynosi 1 : 1;
2. kombinacja związków wykazuje silniejsze niż związki stosowane pojedynczo działanie proapoptotyczne, prooksydacyjne i genotoksyczne;
3. kombinacja zaburza przebieg cyklu komórkowego komórek raka jajnika; pod wpływem jej działania komórki opuszczają blok G2/M (poślizg mitotyczny) i giną na drodze apoptozy;
4. w mechanizm działania kombinacji związków zaangażowane są białka EpCAM i HMGB1, które regulują cykl komórkowy oraz służą jako czynnik prognostyczny.

Autorka wskazała w pracy 9 pozycji literatury uzupełniającej. Są to w większości prace anglojęzyczne z ostatnich kilku lat, w dwóch pracach Doktorantka jest współautorem.

Rozprawę doktorską mgr Barbary Bukowskiej oceniam bardzo wysoko. Uzyskane wyniki w toku przeprowadzonych eksperymentów mają nie tylko duże walory poznawcze, ale mogą mieć także istotne znaczenie w praktyce klinicznej.

W trakcie lektury opracowania nasunęła mi się pewna uwaga dotycząca używanej nomenklatury onkologicznej. Mianowicie we „Wprowadzeniu” Doktorantka podkreśla między innymi, że „nowotwór jajnika charakteryzuje się najwyższą śmiertelnością spośród wszystkich nowotworów ginekologicznych”, „nowotwór jajnika w początkowych stadiach zaawansowania daje niespecyficzne objawy...”. Z punktu widzenia klinicznego należałoby wskazać jednoznacznie, że chodzi o raka jajnika, ponieważ nowotwór złośliwy jajnika określany jest zgodnie z przyjętą terminologią dla nowotworów złośliwych pochodzenia nabłonkowego jako rak jajnika (także w literaturze anglojęzycznej - „ovarian cancer”). Wśród nowotworów jajnika nowotwory nabłonkowe (rak jajnika) występują w ponad 90 %

przypadków i są najgorzej rokującymi nowotworami ginekologicznymi. Powyższa uwaga nie ma wpływu na bardzo dużą wartość merytoryczną rozprawy.

Rozprawę doktorską mgr Barbary Bukowskiej oceniam w pełni pozytywnie. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną oraz umiejętnością samodzielnego rozwiązania problemu naukowego. Potwierdzają to publikacje, które zostały opublikowane w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym z tzw. listy filadelfijskiej.

Praca spełnia warunki obowiązującej „Ustawy o stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki”.

Na tej podstawie wnoszę od Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Barbary Bukowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę dużą merytoryczną wartość rozprawy oraz wysoki poziom przedstawionych publikacji wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Barbary Bukowskiej.

Łódź, 06.06.2016 r.

  
prof. dr hab. Józef Kędziora