

Recenzja pracy doktorskiej

pt: „Molekularne mechanizmy interakcji WP 631 i epotilonu B w komórkach raka jajnika”

wykonanej przez mgr Barbarę Bukowską

w Katedrze Biofizyki Medycznej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy ważnego aspektu poprawy skuteczności efektu działania przeciwnowotworowego na komórki linii raka jajnika SKOV-3 przez zastosowanie skojarzenia dwóch związków: WP 631 (bisantracykliny zbudowanej z dwóch cząsteczek daunorubicyny połączonych cząsteczką p-ksylenu) i Epotilonu B (Epo B, związek wyodrębniony z mikrobakterii *Sorangium celulosum*, wykazujący działanie zbliżone do taksanów).

Poszukiwania skutecznej terapii przeciw rakowi jajnika wynika z faktu, że ten typ nowotworu jest najczęściej wykrywany w późnym stadium rozwoju i często już z przerzutami do innych narządów. Leczenie raka jajnika najczęściej wymaga operacyjnego usunięcia lub zmniejszenia masy guza, a następnie zastosowania chemioterapii w celu zapobieżenia nawrotom choroby lub przerzutom nowotworu. W chemioterapii raka jajnika, od wielu lat, stosuje się terapię skojarzoną np. cisplatynę skojarzoną z taksanami (paklitakselem lub docetakselem) często wspieraną antracyklinami lub ostatnio inhibitorami angiogenezy (np. monoklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciw czynnikowi wzrostu śródbłonna naczyń VEGF (ang. vascular endothelial growth factor). Terapia skojarzona ma na celu zwielokrotnienie skuteczności w wyniku synergicznego lub co najmniej addytywnego mechanizmu działania, co powinno skutkować obniżeniem dawek leków i częściową eliminacją efektów ubocznych wywołanych toksycznością zastosowanych chemioterapeutyków. Ponadto terapia skojarzona może także przeciwdziałać nabywaniu oporności na dotychczas stosowane leki. Wymienione zalety skojarzonej terapii w leczeniu raka jajników były podstawą podjęcia i przeprowadzenia pracy badawczej recenzowanej rozprawy doktorskiej mgr Barbary Bukowskiej. W niniejszej pracy Doktorantka badała efekt przeciwnowotworowego działania kombinacji dwóch związków: WP 631 i Epo B na komórki linii raka jajnika SKOV-3.

Pracę doktorską stanowi cykl pięciu publikacji naukowych, który Doktorantka zatytułowała „Molekularne mechanizmy interakcji WP 631 i epotilonu B w komórkach raka jajnika”. Cykl publikacji został opatrzone wstępem wyjaśniającym cel pracy oraz podsumowaniem wyników przeprowadzonych badań. Podkreślić należy fakt, że wyniki badań mgr Barbary Bukowskiej już zostały opublikowane i to w renomowanych czasopismach o zasięgu ogólnosiwiatowym, w tym cztery z prac z IF (współczynnikiem oddziaływania) w

granicach 2,0 – 2,7. Sumaryczna wartość współczynnika IF publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe pracy doktorskiej mgr Barbary Bukowskiej wynosi 9,77 (i 114 punktów MNiSW). Doktorantka jest pierwszym autorem w trzech pracach, w tym dwóch pracach przeglądowych i jednej oryginalnej. Natomiast w pozostałych dwóch pracach oryginalnych jest współautorem i w tych pracach doktorantka swój udział oszacowała na 45 %. W skład osiągnięcia naukowego recenzowanego doktoratu wchodzi następujące publikacje:

1. **Bukowska B.**, Gajek A., Marczak A. Two drugs are better than one. A short history of combined therapy of ovarian cancer. *Contemp. Oncol.*, 2015,19(5):350-353. (praca przeglądowa nt. dotychczas stosowanej chemoterapii w leczeniu raka jajnika).
2. Marczak A., **Bukowska B.**, Rogalska A. WP 631 and Epo B synergizm In SKOV-3 human ovaria 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):1299-1308.
5. **Bukowska B.**, Rogalska A., Marczak A. New potential chemotherapy for ovaria cancer – Combined therapy with WP 631 and epothilone B. *Life Sci.*, 2016,151:86-92.

Cykl prac został poprzedzony krótkim kompendium, które zawiera: wstęp poświęcony ogólnym danym epidemiologicznym i farmakologicznym nt raka jajnika, omówieniu celu pracy i wyników prac doświadczalnych, będących przedmiotem cytowanych publikacji, oraz podsumowaniem wyników. Natomiast w zamieszczonym wprowadzeniu do cyklu publikacji brak konkluzji np. o możliwościach klinicznego wykorzystania uzyskanych wyników. Chociaż z danych literaturowych brak wiedzy na temat patogenezy raka jajników, to zamieszczone kompendium Doktorantka powinna wzbogacić o powszechnie wskazywane czynniki ryzyka rozwoju tego typu nowotworu jak i opis najczęściej występujących efektów ubocznych dotychczas stosowanej chemioterapii. Ponadto, w podanej we wstępie krótkiej historii skojarzonej chemioterapii raka jajników Doktorantka nie przedstawiła nowych trendów w doborze skojarzonej chemioterapii blokującej szlaki angiogenezy czy system naprawy DNA, chociaż opisuje taką terapię w publikacji przeglądowej z roku 2016. Należy nadmienić, że obecnie wielkie nadzieje wiązane są z inhibitorami angiogenezy (m.in. inhibitorami czynnika wzrostu fibroblastów, FGF i czynnika wzrostu śródbłonka naczyń, VEGF) oraz związkami blokującymi aktywność polimerazy poly-ADP-rybozy, PARP, enzymu uczestniczącego w naprawie DNA. W chwili obecnej te nowe schematy skojarzonej terapii są przedmiotem badań klinicznych i zasługują na poszerzony ich opis np. opis skuteczności leku olaparibu.

Analiza metod badawczych opisanych w prezentowanym cyklu publikacji pozwala podkreślić, że warsztat badawczy Doktorantki dotyczący biologii komórki jest obszerny i nowoczesny. Ponadto zaprojektowane prace doświadczalne układają się w logiczną całość i obejmują:

- (i) badanie właściwości cytostatycznych poprzez wyznaczenie IC_{50} (z użyciem MTT analizy) oraz oszacowanie (metodą analizy izoblograficznej) mechanizmu interakcji dwóch związków zastosowanej kombinacji związków: WP 631 (nowego analogu antracyklin) i Epo B (związku posiadającego mechanizm działania zbliżony do taksanów),
- (ii) badanie właściwości proapoptotycznych zastosowanej kombinacji w/w związków. W tym celu przeprowadzono ocenę liczby komórek apoptotycznych i nekrotycznych, stosując metody podwójnego barwienia za pomocą: Hoechst33258 i jodku propidyny w jednej analizie oraz annexyny i jodku propidyny w drugiej. Dodatkowo Doktorantka potwierdziła indukowanie apoptozy poprzez: pomiar zmian błonowego potencjału mitochondriów oraz oznaczenie aktywności enzymów będących markerami zewnętrznego i wewnętrznego szlaku apoptozy, tj. kaspazy 9., 8. i 3.
- (iii) badanie właściwości genotoksycznych, poprzez zastosowanie spektrofluorometrycznej analizy stresu oksydacyjnego i generowanie reaktywnych form tlenu, analizę Tunel – pozwalającą śledzić fragmentację DNA oraz zbadanie uszkodzeń i kinetyki procesu naprawy DNA z użyciem analizy kometowej z zastosowaniem elektroforezy na żelu agarozowym.
- (iv) Badanie wpływu związków WP 631 i Epo B (podanych w skojarzeniu) na cykl komórkowy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej oraz na ekspresję genów (analiza PCR w czasie rzeczywistym) następujących białek mających wpływ na regulację cyklu komórkowego: cyklinozależnej kinazy 1 (CDK1) odpowiedzialnej za przejście cyklu komórkowego z fazy G2 do M, glikoproteiny EpCAM związanej z przejściem z fazy G1 do S i z fazy S do G2 oraz białka HMGB1, które to białka biorą udział w regulacji aktywności cyklin A, D, i E. Należy nadmienić, że wysoka ekspresja genów białek EpCAM i HMGB1 koreluje ze stopniem zaawansowania raka jajnika.

Wymienione metody analityczne z zakresu biologii komórki potwierdzają dobre praktyczne przygotowanie mgr Barbary Bukowskiej do samodzielnego projektowania i prowadzenia badań naukowych. Jednak wskazanym byłoby zamieszczenie, w kompendium do publikacji, podstaw teoretycznych zastosowanych metod badawczych wraz z określeniem sposobu detekcji finalnych produktów analiz, ponieważ podrzędziały „Materiały i Metody” w opublikowanych pracach zawierają jedynie opis procedur/receptur wykonanych analiz. Należy pamiętać, że w świecie rozbudowanej elektroniki, techniki i automatyzacji, a w badaniach biochemicznych stosowanie gotowych zestawów do jakościowej i ilościowej analizy badanych produktów, znajomość teoretycznych podstaw badań diagnostycznych powinna być ważną częścią warsztatu badawczego przygotowywanej rozprawy doktorskiej.

Wyniki badań wykonanych przez Doktorantkę wskazują, że: (i) kombinacja związków WP 631 z Epo B wywołuje synergiczny mechanizm działania na komórki linii raka jajnika SKOV-3 co pozwala na znaczące (2,5- krotne w stosunku do wartości IC_{50}) obniżenie dawek, a to może skutkować zmniejszeniem efektów ubocznych, (ii) mechanizm działania zastosowanej kombinacji obejmuje: nasilenie apoptozy w stosunku do działania każdego z zastosowanych samodzielnie związków, zwiększonego generowania reaktywnych form tlenu i wzrostu genotoksyczności, przy jednoczesnym osłabieniu systemu naprawy DNA, (iii) komórki linii

SKOV-3 giną na drodze apoptozy po opuszczeniu fazy G2/M cyklu komórkowego, (iv) zastosowana kombinacja związków WP 631 i Epo B, prowadzi do obniżenia ekspresji genów białek EpCAM i HMGB1 co wpływa na obniżenie proliferacji badanych komórek nowotworowych.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem uważam, że recenzowana praca doktorska, składająca się z 5. publikacji (trzech oryginalnych i dwóch przeglądowych) zebranych w cykl pt. „Molekularne mechanizmy interakcji WP 631 i eptilonu B w komórkach raka jajnika” w pełni spełnia wymogi stawiane takim dysertacjom. Praca zawiera elementy nowości i stanowi o indywidualnym i nowatorskim wkładzie Doktorantki w poszukiwanie nowych kombinacji leków przeciwdziałających rozwojowi nowotworów jajnika. Elementem nowości pracy doktorskiej mgr Barbary Bukowskiej jest zbadanie mechanizmu przeciwdziałania rozwojowi komórek linii raka jajnika SKOV-3 przez kombinację związków WP 631 z Epo B, które to związki wywodzą się z antracyklin i makrolidu syntetyzowanego przez mykobakterie. Wyniki badań są nie tylko wartościowe pod względem naukowym i poznawczym ale zapewne będą stanowiły dobry punkt odniesienia do dalszych badań z tymi związkami na modelach zwierzęcych, i jak się wydaje mogą być użyteczne dla projektowania nowych schematów leczenia raka jajnika.

Praca Doktorska mgr Barbary Bukowskiej spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, a zatem rozprawa ta spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z póź. zm.). Pracę tę oceniam wysoko.

Na tej podstawie pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Barbary Bukowskiej i dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto z uwagi, że wyniki prac doświadczalnych zostały już opublikowane w pięciu pracach naukowych w renomowanych czasopismach anglojęzycznych, wnioskuję o wyróżnienie pracy.

KIEROWNIK
ZAKŁADU CHEMII BIOMEDYCZNEJ
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
K. Fabianowska-Majewska
Prof. dr hab. n. med. Krystyna Fabianowska-Majewska