



Dr hab. Dorota Bonarska-Kujawa  
Katedra Fizyki i Biofizyki  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 18.11.2018

### Ocena

#### **pracy doktorskiej mgr Marty Denel-Bobrowskiej na temat: „Wpływ pochodnych doksorubicyny ze zmodyfikowaną daunozaminą na komórki raka jajnika”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy bardzo ważnego zagadnienia związanego z poszukiwaniem nowych i skutecznych metod terapii raka jajnika, który pod względem zapadalności i umieralności wśród kobiet zajmuje 7 miejsce na całym świecie. Zarówno ze względu na diagnozę, jak i na terapię nowotwór jajnika stanowi dla współczesnej medycyny poważne wyzwanie. Spadek przeżywalności wśród kobiet dotkniętych tą chorobą jest ściśle związany z późnym stadium choroby w momencie jej wykrycia. Niespecyficzne objawy choroby, a także niedostateczna skuteczność biomarkerów stosowanych w badaniach przesiewowych powodują, że bardzo pilnym problemem staje się poszukiwanie nowych skutecznych leków oraz schematów leczenia raka jajnika. Współczesna medycyna onkologiczna, mimo rosnącego postępu w tej dziedzinie, nie jest aktualnie w stanie zaproponować całkowicie skuteczniejszej i bezpieczniejszej terapii w leczeniu tych nowotworów. Stosowane do tej pory leki w terapii podstawowej, zawierające związki platyny oraz doksorubicynę, nie przyniosły oczekiwanych rezultatów, ze względu na szereg skutków ubocznych, jak również z powodu rozwijającej się w trakcie leczenia oporności wielolekowej (MDR). Obecnie trwają badania, które skupiają się na znalezieniu skutecznych leków przeciwnowotworowych o obniżonej cytotoksyczności w odniesieniu do niezmiennych komórek i jednocześnie nieindukujących oporności wielolekowej organizmu. Substancji tych poszukuje się zarówno na drodze syntezy nowych związków, jak i na drodze modyfikacji już istniejących leków. Takim przykładem jest doksorubicyna stosowana w nawrotach raka jajnika, która należy do grupy antybiotyków antracyklinowych. Związek ten poza dużą skutecznością, niestety wykazuje efekty uboczne w postaci kardiotoxyczności i może prowadzić do oporności wielolekowej. Jak wykazały wstępne badania nowe pochodne formamidynowe i oksazolinowe doksorubicyny, zsyntetyzowane w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie, są cytotoksyczne w odniesieniu do komórek rakowych opornych na doksorubicynę.



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

W przedstawionej mi do oceny rozprawie doktorskiej Pani mgr Marta Denel-Bobrowska podjęła bardzo istotne dla medycyny onkologicznej badania, dotyczące wyłonienia potencjalnych leków spośród 6 otrzymanych na drodze syntezy pochodnych doksorubicyny, które będą nie mniej skuteczne, jednak mniej toksyczne dla organizmu. Doktorantka podjęła się także próby określenia mechanizmów leżących u podstaw cytotoksycznego działania tych związków i odpowiedzialnych za indukowanie przez nie śmierci komórkowej w odniesieniu do komórek SKOV-3, gruczolaka jajnika opornych na doksorubicynę. Takie badania nie zostały do tej pory przeprowadzone.

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem promotora pani prof. dr hab. Agnieszki Marczał w Katedrze Biofizyki Medycznej, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego oraz przy współpracy z Instytutem Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie i pod opieką pani dr inż. Małgorzaty Łukawskiej, w charakterze promotora pomocniczego. Badania zrealizowane w ramach pracy doktorskiej były współfinansowane z dwóch źródeł: indywidualnego stypendium stanowiącego dofinansowanie badań realizowanych w zakresie tematu: „Wpływ wybranych pochodnych doksorubicyny na komórki raka jajnika” oraz stypendium naukowego miasta Łodzi dla doktorantów w latach 2013 - 2014.

Rozprawę doktorską stanowi cykl pięciu spójnych tematycznie prac doświadczalnych, dotyczących toksycznego działania pochodnych doksorubicyny formamidynowych i oksazolinowej, a także mechanizmów ich działania w odniesieniu do komórek raka jajnika SKOV-3 oraz innych wybranych linii komórek rakowych. Prace te zostały opublikowane w czasopiśmie z bazy *Journal Citation Reports* o zasięgu międzynarodowym. W skład rozprawy doktorskiej wchodzi następujące prace:

1. Marczał A., Denel-Bobrowska M., Rogalska A., Łukawska M., Oszczapowicz I., *Cytotoxicity and induction of apoptosis by formamidinodoxorubicins in comparison to doxorubicin in human ovarian adenocarcinoma cells*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2015, 39(1):369-383,

2. Denel-Bobrowska M., Łukawska M., Oszczapowicz I., Marczał A. *Histological subtype of ovarian cancer as determinant of sensitivity to formamidine derivatives of doxorubicin – in vitro comparative studies with SKOV-3 and ES-2 cancer cell lines*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2016, 17 (9):4223-4331,

3. Denel-Bobrowska M., Łukawska M., Rogalska A., Forma E., Bryś M., Oszczapowicz I., Marczał A. *Identification of the key pathway of oxazolinoanthracyclines mechanism of action in cells derived from human solid tumors*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2016, 313:159-169,



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

4. Denel-Bobrowska M., Łukawska M., Bukowska B., Gajek A., Oszczapowicz I., Marczak A. *Molecular mechanism of action of oxazolinoanthracyclines in cells derived from human solid tumors. Part 2.* Toxicology in Vitro 2018, 46:323-334. Errata: Toxicology in Vitro 2018, 48:350-352,

5. Denel-Bobrowska M., Marczak A. *Structural modification in sugar moiety as a key to improving the anticancer effectiveness of doxorubicin.* Life Sciences 2017, 178:1-8.

Warto podkreślić, że sumaryczna wartość IF publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi zgodnie z rokiem opublikowania 12.07 oraz 140 punktów MNiSW.

Do rozprawy doktorskiej zostały również dołączone pisemne oświadczenia współautorów wyżej wymienionych prac o ich udziale procentowym w poszczególnych publikacjach. W pierwszej pracy Doktorantka jest drugim autorem, a w pozostałych pracach pierwszym. Zgodnie z oświadczeniami współautorów procentowy udział Doktorantki w poszczególnych pracach jest dominujący i stanowi odpowiednio 45, 75, 55, 65 i 80 %. Ponadto z oświadczeń współautorów prac wynika, że pani mgr Denel-Bobrowska uczestniczyła aktywnie na etapie planowania i wykonywania badań, które następnie potrafiła opracować i opisać w formie publikacji. W pracach 2-5 pełniła również rolę autora korespondencyjnego. Świadczy to nie tylko o dużym zaangażowaniu Doktorantki w przeprowadzone badania na każdym etapie ich realizacji, ale również o godnej uwagi dojrzałości naukowej pani mgr Denel-Bobrowskiej.

O dużej aktywności naukowej Doktorantki świadczy również Jej dorobek naukowy, który zgromadziła poza pracami stanowiącymi rozprawę doktorską, a na który składa się dziewięć artykułów opublikowanych w czasopismach zarówno z listy JCR tj: Toxicology in Vitro, Anticancer Research czy Asian Pacific Journal of Cancer Prevention (odpowiednio 30, 20 i 20 pkt MNiSW oraz IF 2.903, 1.895 i 2.514), jak i w innych czasopismach polskich i zagranicznych oraz w materiałach pokonferencyjnych. Jest też współautorką w sumie 20 prezentacji ustnych i komunikatów konferencyjnych, przedstawionych na 18 konferencjach naukowych, w tym sześciu konferencjach międzynarodowych. Należy również podkreślić, że sumaryczny IF dorobku publikacyjnego łącznie z pracami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej, zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi 19.76 oraz 240 pkt MNiSW. Doktorantka ponadto uczestniczyła w miesięcznym stażu naukowym w Instytucie Biofizyki i Bioinżynierii Komórki w Akademii Nauk w Mińsku na Białorusi, w ramach SEVENTH FRAMEWORK PROGRAMME, Maria Curie Action. Dorobek naukowy pani mgr Denel-Bobrowskiej jest imponujący, świadczy o dużym potencjale naukowym Doktorantki i oceniam go bardzo wysoko.



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

Poza spisem i kopiami publikacji do rozprawy doktorskiej Doktorantka dołączyła również następujące rozdziały: wprowadzenie, podsumowanie, wnioski, streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim, pozostały dorobek naukowy i piśmiennictwo.

Omówienie celu naukowego rozprawy i uzyskanych wyników Doktorantka krótko podsumowuje w następujących podrozdziałach wprowadzenia: uzasadnienie tematu badań, materiały oraz metody badawcze, cel pracy, hipoteza badawcza, szczegółowe cele badawcze, omówienie prac wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej. We wprowadzeniu pani mgr Marta Denel-Bobrowska w sposób syntetyczny zarysowała problematykę związaną z trudnościami występującymi w leczeniu nowotworów jajnika oraz kierunkami poszukiwań nowych skutecznych leków możliwych do zastosowania w terapii, na podstawie doniesień literaturowych opublikowanych głównie w latach 2005-2017. Uzasadniła wybór materiału badawczego, jaki stanowiły linie komórkowe gruczolaka jajnika SKOV-3, odporne na działanie doksorubicyny, jak również w dalszej części badań linie komórkowe raka jajnika ES-2, wątroby HepG2 i płuc A549. Doktorantka uzasadniła również wybór 6 analogów doksorubicyny, jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych, który został podyktowany wstępnymi wynikami badań toksyczności wielonarządowej dla tych związków. Na stronie 7 rozprawy we wprowadzeniu oraz na stronie 9 w materiałach i metodach badawczych Doktorantka powołuje się na wcześniejsze badania wybranych analogów doksorubicyny opublikowane w pracach min. Wąsowska i wsp. 2005a i b oraz Łukawska i wsp. 2012, w których wykazano korzystniejszy profil toksyczności tych związków, niż wykazuje je doksorubicyna. Badań tych jednak nie przytacza. Zainteresowało mnie na podstawie jakich badań określono korzystniejszy profil toksyczności tych związków i w odniesieniu do jakich komórek? Co najbardziej zachęciło Doktorantkę do wybrania do swoich dalszych badań nad mechanizmem działania właśnie tych związków: 5 formamidynowych i 1 oksazolinowej pochodnej doksorubicyny? Jak duże znaczenie w doborze związków miała ich struktura chemiczna?

Celem badawczym pracy doktorskiej, poprawnie sformułowanym przez Doktorantkę, była ocena aktywności cytotoksycznej 6 wybranych pochodnych doksorubicyny na komórki SKOV-3. Jako szczegółowe cele badawcze doktorantka wymieniła analizę cytotoksyczności związków względem komórek SKOV-3, ocenę ich zdolności do indukowania programowanej śmierci komórkowej oraz określenie głównych mechanizmów odpowiedzialnych za ich aktywność cytotoksyczną.

W dalszej części pani mgr Marta Denel-Bobrowska krótko omówiła prace wchodzące w skład rozprawy. Warto dodać, że przedstawiona do oceny w ramach rozprawy seria publikacji, stanowi spójny tematycznie i szczegółowo zaplanowany oraz zrealizowany cykl ciekawych badań. Ich tematem



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

przewodnim jest: Wpływ pochodnych doksorubicyny ze zmodyfikowaną daunozaminą na komórki raka jajnika. W świetle opublikowanych wyników rodzi się pytanie. Na str. 12 w omówieniu prac wchodzących w skład rozprawy Doktorantka napisała, że „najmniej cytotoksyczny okazał się analog DOX-F HEX, co może być spowodowane dużym rozmiarem pierścienia, czyli występowaniem większej zawady przestrzennej utrudniającej oddziaływanie z helisą”. Czy w świetle uzyskanych przez Doktorantkę wyników można podjąć próbę wykazania korelacji między strukturą związku, a jego cytotoksycznością?

Na szczególną uwagę w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej zasługuje bogaty i precyzyjnie zaplanowany, pod kątem realizacji celu pracy, warsztat badawczy Doktorantki. Pani mgr Marta Denel-Bobrowska wykonała różnymi i umiejętnie dobranymi, nowoczesnymi metodami fizycznymi i analitycznymi szereg badań i oznaczeń na liniach komórkowych indukowanych badanymi związkami. Doktorantka wykonała następujące badania: cytotoksyczności badanych związków (test MTT), lokalizacji związków w komórkach, parametrów wnikania związków do komórek, morfologii komórek, oraz struktury błony komórkowej, potencjału mitochondrialnego, fragmentacji DNA (test TUNEL), ekspresji genów (metoda RT PCR), i wpływu związków na cykl komórkowy. Na uwagę zasługuje duża różnorodność wykonanych przez Doktorantkę badań z wykorzystaniem fluorescencyjnych technik badawczych: cytometrii przepływowej, spektroskopii i mikroskopii przy użyciu szeregu znaczników fluorescencyjnych oraz testów biochemicznych. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły Doktorantce w pełni zrealizować cel badań.

W trakcie analizowania tej części rozprawy nasunęły mi się jedna uwaga. Przy formułowaniu celu pracy i omawianiu prac stanowiących rozprawę Doktorantka w kilku miejscach zamiennie stosowała sformułowanie aktywność biologiczna i aktywność cytotoksyczna w odniesieniu do swoich badań i ich wyników. Aktywność biologiczna jest pojęciem szerszym niż aktywność cytotoksyczna i dotyczy wszelkich zmian zachodzących w komórkach prawidłowych i nieprawidłowych pod wpływem czynników zewnętrznych. W przypadku prezentowanych badań raczej należałoby mówić jednoznacznie i precyzyjnie o aktywności cytotoksycznej szczególnie, że nie zostały przytoczone wyniki innych badań w odniesieniu do komórek prawidłowych, a związki zostały zaprojektowane, jako toksyczne dla komórek nowotworowych.

Na podstawie uzyskanych wyników pani mgr Marta Denel-Bobrowska sformułowała interesujące wnioski. Stanowią one w mojej ocenie oryginalne osiągnięcie Doktorantki, gdyż zawierają ważne i nowe aspekty poznawcze dotyczące aktywności cytotoksycznej wybranych pochodnych doksorubicyny w



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

odniesieniu do komórek gruczolaka jajnika. Ważny wniosek z przeprowadzonych badań, to ten, w którym Doktorantka stwierdza: za ważny i wymagający dalszych badań należy uznać związek DOX-F MOR, który wydaje się być najlepszym w badanej grupie, potencjalnie skutecznym lekiem przeciwnowotworowy w terapii raka jajnika. Mam pytanie do pani mgr Denel-Bobrowskiej, czy ma w planach kontynuację badań na innych liniach komórkowych lub włączenia się np. w badania przedkliniczne nad skutecznością badanego związku w terapii nowotworów?

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską pani mgr Marty Denel-Bobrowskiej. Na jej dużą wartość merytoryczną składają się umiejętnie zaplanowane i przeprowadzone badania opublikowane w renomowanych czasopismach, które dotyczą aktualnego i bardzo ważnego problemu, jakim jest skuteczna terapia nowotworów, ratująca ludzkie życie. Doktorantka wykazała się przy tym dużymi umiejętnościami samodzielnego prowadzenia badań eksperymentalnych oraz znajomością problematyki z zakresu farmakologii, cytobiologii i biofizyki. W swojej rozprawie przedstawiła oryginalne i nowoczesne badania, które mają charakter nowatorski i poznawczy, a w przyszłości także aplikacyjny. Rozprawa doktorska pani mgr M. Denel-Bobrowskiej spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku. Uważam, że przedłożona mi do oceny rozprawa jest podstawą do nadania Doktorantce stopnia naukowego Doktora w dziedzinie nauk biologicznych, w dyscyplinie biofizyka.

Zwracam się, więc z uprzejmą prośbą do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Marty Denel-Bobrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę niezwykle bogaty dorobek naukowy pani mgr Marty Denel-Bobrowskiej, zakres i jakość przeprowadzonych przez nią badań, zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej i nagrodzenie Doktorantki.

Dr hab. inż. Dorota Bonarska-Kujawa

KIEROWNIK  
Katedry Fizyki i Biofizyki  
  
Dr hab. inż. Dorota Bonarska-Kujawa