

Łódź 3.01.2019

dr hab.med. Marlena Broncel  
Klinika Chorób Wewnętrznych  
i Farmakologii Klinicznej  
ul. Kniaziewicza 1/5  
91-347 Łódź  
Tel/fax 42 651 10 59  
e-mail:marlena.broncel@umed.lodz.pl

### Ocena

**Rozprawy doktorskiej Marty Denel-Bobrowskiej zatytułowanej  
„Wpływ pochodnych doksorubicyny ze zmodyfikowaną daunozaaminą  
na komórki raka jajnika”**

Rozprawa składająca się z 106 stron zawiera osiągnięcie naukowe obejmujące cykl pięciu publikacji z lat 2015-2018 o łącznym współczynniku oddziaływania 12.07, MNiSW-140. Dysertację dostarczono do opiniowania zarówno w formie wydrukowanej, jak i na nośniku elektronicznym.

Dzieło zawiera oświadczenia wszystkich współautorów z określeniem procentowego udziału każdego z nich oraz wykaz pozostałego dorobku naukowego. Sumaryczny IF dorobku publikacyjnego Doktorantki łącznie z publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej jest imponujący wynosi bowiem 19.76 (240 MNiSW). Na uwagę zasługuje też czynny udział Doktorantki w wielu konferencjach o zasięgu krajowym i zagranicznym w formie 5 doniesień ustnych i 15 plakatów. W 2016 odbyła miesięczny staż w Instytucie Biofizyki i Bioinżynierii Komórki w Akademii Nauk w Mińsku na Białorusi w ramach SEVENTH FRAMEWORK PROGRAMME, Marie Curie actions.

Za swoje osiągnięcia otrzymała stypendium naukowe Miasta Łodzi dla Doktorantów w latach 2013/2014.

Autorka celem ułatwienia odbioru publikacji opracowała bardzo starannie wprowadzenie, w którym porusza problemy leczenia raka jajnika. Zwraca uwagę na częstość występowania, podkreślając, że nowotwór ten zajmuje 7 miejsce pod względem zapadalności i umieralności wśród kobiet na całym świecie. Głównymi przyczynami wysokiej umieralności

są: a) zbyt późne wykrywanie, b) brak wysoce czułego i swoistego markera, c) kardiotoxycność antybiotyków antracyklinowych. Niestety skutki kardiotoxycności antracyklin mogą pojawiać się kilka, a nawet kilkanaście lat po zakończeniu terapii i prowadzić do ciężkich kardiomiopatii oraz zgonu pacjentki. Zatem wciąż podejmowane są próby zsyntetyzowania substancji, które byłyby co najmniej tak skuteczne jak doksorubicyna, ale pozbawione działań niepożądanych.

Obecnie związkami o bardzo obiecujących właściwościach przeciwnowotworowych są formamidynoantracykliny. W oparciu o dostępne publikacje Doktorantka podjęła próbę wyjaśnienia zjawisk leżących u podstaw cytotoxycznego wpływu tych związków na komórki oraz mechanizmu indukowania śmierci komórkowej. Głównym celem pracy było określenie wpływu 6 analogów doksorubicyny (DOX-F PIP, DOX-F PYR, DOX-F MOR, DOX-F HEX, DOX-F PAZ, O-DOX) na komórki SKOV-3 i wytypowanie związków o lepszej aktywności biologicznej niż doksorubicyna. Po postawieniu hipotezy badawczej Autorka wyznaczyła w sposób logiczny i konkretny trzy cele szczegółowe. Tak zaplanowany schemat działania świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki i udawadnia, że wykonywane przez Nią eksperymenty nie były dziełem przypadku, ale wynikiem wnikliwej analizy tematu.

Doktorantka wykorzystała 4 linie komórkowe: a) SKOV-3- komórki gruczolakoraka jajnika- odporne na doksorubicynę i cis-platynę; b) ES-2- komórki jasnokomórkowego raka jajnika c) A549- komórki niedrobnokomórkowego raka płuc d) HepG2- komórki raka wątrobowokomórkowego. Warto podkreślić, że do eksperymentów zostały wybrane linie komórkowe wywodzące się z raków o bardzo złym rokowaniu z powodu wysokiej zdolności do przerzutowania i często występującej oporności na chemioterapeutyki.

Badania przeprowadziła za pomocą 9 metod wykorzystując między innymi mikroskopię konfokalną, spektrofotometrię, cytometrię przepływową, real time PCR. Wspomnianą już cytometrię przepływową zastosowała do analizy wpływu badanych związków na cykl komórkowy, strukturę błon komórkowych, za pomocą metody spektrofotometrycznej oceniała parametry wnikania związków do komórek, zmiany potencjału mitochondrialnego. Określiła także cytotoxycność badanych analogów, dokonała analizy fragmentacji DNA za pomocą testu TUNEL i testu kometowego oraz zbadała ekspresję wybranych genów kodujących białka związane z apoptozą : PARP-1(poly ADP-ribose polymerase-1); H2AFX (H2 histone family member X), BIRC5 (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5; BCL-2 B-cell lymphoma 2 , cytochrom c, kaspaza-9, kaspaza-3.

Zrozumienie programowanej śmierci komórki indukowanej przez pochodne doksorubicyny i różnice w ich cytotoksyczności ułatwiają schematy na stronie 18 stanowiące graficzne podsumowanie wyników badań.

W pięciu wybranych do osiągnięcia pracach Pani Marta Denel-Bobrowska jest pierwszym autorem czterech publikacji o IF=9,76 (MNiSW=115).

W pierwszej z prac Autorka stosując różne techniki badawcze (mikroskopowe, cytometryczne) oceniała zmiany morfologiczne i biochemiczne wskazujące na apoptozę komórek. W linii komórkowej SKOV-3 po ekspozycji na badane analogi doksorubicyny obserwowała kondensację chromatyny, zmiany kształtu i rozmiaru jądra komórkowego, powstawanie ciał apoptotycznych. Warto nadmienić, że najkorzystniejszy efekt w postaci wysokiego odsetka komórek apoptotycznych obserwowała dla DOX-F PIR i DOX-MOR.

W kolejnej pracy Doktorantka rozszerzyła eksperymenty o fluorymetryczne oznaczenia aktywności kaspazy -8 oraz-9. Wszystkie badane formamidynowe analogi doksorubicyny wywołały wzrost aktywności kaspazy-8, przy czym dla pochodnej DOX-F MOR aktywacja kaspazy-9 była ponad ośmiokrotnie wyższa niż dla związku referencyjnego. W tej samej publikacji Autorka przedstawiła wyniki eksperymentu dotyczącego pomiaru potencjału błony mitochondrialnej. Największy spadek potencjału mitochondrialnego odnotowała dla pochodnej DOX-F MOR.

Dwie kolejne prace zostały poświęcone badaniom nad właściwościami cytotoksycznymi oksazolinodoksorubicyny (O-DOX). W modelu doświadczalnym z linią komórkową SKOV-3 Doktorantka zaobserwowała ponad pięciokrotnie wyższą cytotoksyczność oksazolinowej pochodnej niż samej doksorubicyny. Kilkukrotnie niższe wartości IC50 wykazała w innych liniach komórkowych (raka wątroby i płuca). W pracy trzeciej oprócz oksazolinowej pochodnej doksorubicyny zbadała właściwości oksazolinodaunorubicyny, której cytotoksyczność była wyższa niż związku macierzystego, ale tylko w przypadku komórek raka wątroby.

W pracy czwartej Doktorantka zaobserwowała, że oksazolinodoksorubicyna wnika do wnętrza komórek SKOV-3 i umiejscawia się podobnie jak antracyklina macierzysta. Analiza porównawcza parametrów wnikania analogów do komórek nie wykazała istotnych statystycznie różnic w porównaniu z doksorubicyną. Doktorantka zwróciła uwagę, że badane związki osiągają niemal identyczne wewnątrzkomórkowe stężenia to jednak posiadają zróżnicowane właściwości cytotoksyczne oraz wykazują istotne różnice w indukowaniu apoptozy. Przy użyciu metody kometowej Autorka uwidoczniała w komórkach traktowanych O-DOX wyższy średni poziom uszkodzeń DNA we wszystkich badanych czasach inkubacji w

porównaniu do komórek indukowanych doksorubicyną. W kolejnych etapach badań analizowała ekspresję genów kodujących białka zaangażowane w proces apoptozy wykazując aktywację genów związanych ze szlakiem mitochondrialnym apoptozy oraz niski poziom genu kodującego białko Bcl-2.

Cykl prac zamyka praca przeglądowa przedstawiająca podsumowanie wpływu pochodnych doksorubicyny na komórki nowotworowe. Przekształcenie grupy  $-NH_2$  przy atomie węgla C-3' części daunozaminowej antracyklin w trójpierścieniową grupę amidynową skutkuje otrzymaniem analogów o zwiększonej aktywności cytotoksycznej wobec komórek nowotworowych. Najbardziej obiecującym analogiem wydaje się być pochodna doksorubicyny posiadająca w ugrupowaniu amidynowym resztę cyklicznej aminy II-rzędowej z sześciocłonowym pierścieniem morfoliny.

Doktorantka zamyka opracowanie podsumowaniem i wnioskami odpowiadającymi celom pracy i udowadnia wysnutą na początku hipotezę badawczą.

Konkluzje te, oprócz dobrego zwięźczenia dzieła, są bardzo trafnymi obserwacjami poczynionymi samodzielnie w oparciu o opublikowane prace.

Trudno pisać o niedociągnięciach w przypadku opublikowanych już i ocenionych przez recenzentów znakomitych czasopism. Na uznanie zasługują te tezy składowe cyklu, w których Kandydatka jest pierwszym autorem. Dowodzą one, że Doktorantka posiada umiejętność zaprojektowania, przeprowadzenia żmudnych i skomplikowanych eksperymentów. Uzyskany duży materiał został poprawnie opracowany, szeroko przedyskutowany w odniesieniu do aktualnego piśmiennictwa oraz posłużył do sformułowania istotnie ważnych wniosków. Oczywiście praca, w której Kandydatka jest współautorem dodatkowo podnosi wartość osiągnięcia naukowego. Ważną pozycją jest praca przeglądowa, która z pewnością będzie wielokrotnie przez innych badaczy cytowana ze względu na bardzo spójne, obszerne przedstawienie mechanizmów cytotoksyczności doksorubicyny i jej analogów.

Dla mnie jako lekarza największą wartością tej pracy jest próba porównania różnych analogów doksorubicyny. Mam nadzieję, że w niedalekiej przyszłości analog doksorubicyny zawierający morfolinę okaże się skuteczną i bezpieczną substancją w leczeniu raka jajnika, czego życzę wszystkim kobietom. Gratuluję podjęcia się tak trudnego i bardzo ważnego z punktu widzenia praktycznego zagadnienia. Gdyby nie tego rodzaju badania medycyna kliniczna nie miałaby nic do zaoferowania choremu. Sukcesem medycznym jest nie tylko trafna diagnoza, ale również możliwość skutecznego i bezpiecznego leczenia pacjenta.

Uważam, że cykl 5 prac zaprezentowanych przez Doktorantkę stanowi istotny wkład w rozwój wiedzy na temat właściwości cytotoksycznych pochodnych dokсорubicyny i potencjalnych możliwości wykorzystanie ich w leczeniu raka jajnika. Prace stanowią zwarty, monotematyczny cykl odpowiadający zaproponowanemu tytułowi.

Tematyka jest niezmiernie ciekawa, łącząca nauki podstawowe z kliniczną medycyną. Temat pracy zasługuje na dalsze kontynuowanie.

*Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U nr 65, poz 595 z późn.zm.)*

**Zatem mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego wnioszek o dopuszczenie Pani mgr Marty Denel-Bobrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Ze względu na wysokie walory merytoryczne, ogromną wartość poznawczą i fakt opublikowania składowych prac w wysokopunktowanych czasopismach medycznych proponuję wyróżnienie pracy.**

dr hab. n.med. Marlena Broncel

Kierownik  
Kliniki Chorób Wewnętrznych  
i Farmakologii Klinicznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
*Broncel*  
Dr hab. n. med. Marlena Broncel

