

Recenzja rozprawy doktorskiej
Wydział Biologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Imię i nazwisko kandydata: **Katarzyna Śladowska**

Tytuł rozprawy doktorskiej: **Efekty działania pochodnych fenytoiny na komórki leukemiczne**

Promotor: **dr hab. Lidia Mazur**

Recenzent: **prof. dr hab. Joanna Wietrzyk**

1. **Wartość naukowa rozprawy**

a. Oryginalność badań:

Podjęta przez mgr Katarzynę Śladowską tematyka badań wpisuje się w aktualne wciąż dążenia do opracowania skuteczniejszych metod leczenia przeciwnowotworowego z zastosowaniem chemioterapeutyków, gdyż te obecnie dostępne, mimo wprowadzania wciąż nowych, w tym celowanych leków przeciwnowotworowych nie są zadowalające. Nieustannym problemem pozostają także skutki uboczne, o ograniczenie których dążą naukowcy planujący nowe strategie terapeutyczne w leczeniu przeciwnowotworowym.

Autorka podjęła się zbadania aktywności przeciwnowotworowej pochodnych fenytoiny, a więc związków chemicznych niezbyt dobrze dotąd zbadanych pod tym kątem, stosując jako model komórki ludzkich linii białaczki promielocytarnej i chłoniaka. Uzyskane obiecujące wyniki tych badań, w tym ocena zależności aktywności biologicznej od struktury chemicznej badanych związków dają podstawę do twierdzenia, że tego typu pochodne mogą stanowić bazę do opracowania nowych serii analogów i ich oceny pod kątem SAR oraz wytypowania związków wiodących do dalszych analiz. Uzyskane wyniki dają także wgląd w potencjalne mechanizmy działania przeciwproliferacyjnego pochodnych fenytoiny.

b. Wartość naukowa rozdziałów/artykułów:

Badania przeprowadzone przez mgr Katarzynę Śladowską zostały wykonane na 2 ludzkich liniach białaczki i chłoniaka. Wykorzystała ona w badaniach 4 pochodne fenytoiny o zróżnicowanej strukturze chemicznej, stwierdzając, iż pochodna oznaczona symbolem PH1, nie zawierająca w swojej strukturze podstawnika bromoalkilowego, wykazuje znacznie słabszą aktywność przeciwproliferacyjną wobec tych komórek. Pozostałe 3 pochodne również różniły się między sobą aktywnością, dając Autorce podstawy do stwierdzenia, że wprowadzenie dodatkowego podstawnika (obok bromoalkilowego) do cząsteczki fenytoiny prowadzi do zwiększenia potencjału biologicznego. Jednakże pełna analiza zależności pomiędzy strukturą i aktywnością tego typu związków z pewnością wymagałaby bardziej licznej serii pochodnych fenytoiny. W dalszych badaniach Autorka w sposób kompleksowy oceniła wpływ 3 spośród 4 początkowo badanych pochodnych na różne parametry śmierci komórek oraz na cykl komórkowy. Wyniki tych badań pozwalają stwierdzić, że badane pochodne fenytoiny mogą indukować zarówno apoptozę, jak i prowadzić do nekrozy; w traktowanych nimi komórkach uruchamiają się także procesy autofagii, mogące mieć znaczenie ochronne lub też prowadzić do śmierci komórki, co może wynikać z np. zastosowanego stężenia badanego związku. Jednocześnie następuje zaburzenie przebiegu cyklu komórkowego. Ta szeroka charakterystyka aktywności biologicznej pochodnych fenytoiny umożliwiła zaproponowanie mechanizmu działania badanych związków, jako czynników alkilujących zasady azotowe nukleotydów, co jednak wymaga potwierdzenia doświadczalnego.

Biorąc pod uwagę skąpość dostępnych danych literaturowych omawiających potencjalne właściwości przeciwnowotworowe pochodnych fenytoiny, podejście naukowe do analizy ich właściwości biologicznej zaproponowane przez Autorkę uważam za w pełni uzasadnione. Przeprowadzone badania dostarczyły szeregu nowych informacji na temat wpływu tych związków na komórki nowotworowe, uważam także, że otwierają one drogę do dalszych badań w obszarze tej ciekawej tematyki.

Wyniki swoich badań mgr Katarzyna Śladowska opublikowała w dwóch pracach: Indian J Exp Biol 2016 (IF=0.934), gdzie zawarto wyniki obejmujące pierwszą część pracy, dotyczącą wpływu badanych 4 pochodnych fenytoiny na proliferację komórek HL-60 i U937 oraz w Anticancer Res 2017 (IF=1.935), gdzie opublikowano pozostałe wyniki badań.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

W pierwszej części rozdziału „wstęp”, wprowadzającego w tematykę rozprawy doktorskiej, mgr Katarzyna Śladowska skupiła się na omówieniu pochodnych hydantoiny o potwierdzonych właściwościach przeciwnowotworowych, omawiając również pochodne stosowane w praktyce klinicznej (w raku prostaty), samą fenytoinę i jej pochodne, w tym te, które stały się przedmiotem jej badań. Autorka przedstawia przyczyny, dla których skupiła się na ocenie tych właśnie 4 pochodnych. Ta część wstępu jest bardzo ważnym elementem pracy podsumowującym dotychczasowy stan wiedzy na temat zastosowania pochodnych hydantoiny, jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych. W dalszej części wstępu autorka przechodzi do bardziej technicznych zagadnień, związanych z modelem użytym do badań i zastosowanymi technikami badawczymi. Z jednej strony takie wprowadzenie systematyzujące zagadnienia, które będą analizowane jest cenne, ale z drugiej strony oczekiwałam raczej szerszego omówienia samych pochodnych hydantoiny i ich dotąd opisanych właściwości przeciwnowotworowych, w tym poznanych mechanizmów działania, z mniejszym naciskiem na zagadnienia techniczne.

Autorka jasno formułuje cel pracy i szczegółowo omawia zastosowaną w pracy metodykę badawczą. Mgr Katarzyna Śladowska zastosowała szereg analiz cytometrycznych i mikroskopowych, które w pełni umożliwiły osiągnięcie założonego celu. Wyniki zaprezentowano na przejrzystych, czytelnych wykresach, w tabeli oraz zilustrowano mikrofotografiami, przeprowadzono szczegółową analizę statystyczną danych.

Uzyskane wyniki zostały streszczone w rozdziale dyskusja, który podzielono pod kątem stosowanych metod badawczych. Osobiście bardziej cenię dyskusje wyników prowadzone pod kątem ich znaczenia merytorycznego, a nie pod kątem użytych technik badawczych, jednakże rozumiem, iż dysponując niewielkim zasobem danych literaturowych dostępnym do zderzenia z własnymi wynikami, tak skonstruowana dyskusja była łatwiejsza do przeprowadzenia. W dyskusji wyróżniają się 2 jej ostatnie rozdziały, które potwierdzają, iż doktorantka posiada umiejętności krytycznej analizy uzyskanych danych i sprawnie posługuje się dostępnymi danymi literaturowymi do ich interpretacji. Na zakończenie Autorka formułuje poprawnie 6 wniosków, z których niektóre są raczej podsumowaniem wyników.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Praca ma układ typowy dla eksperymentalnych prac biologicznych, napisano ją jasnym językiem; nie dostrzegam istotnych błędów językowych. Rozdziały podzielono na logicznie skonstruowane podrozdziały ułatwiające śledzenie treści pracy. Tak więc od strony redakcyjnej pracę przygotowano w sposób profesjonalny i staranny.

4. Uwagi krytyczne

Jak wspomniałam wcześniej, odniosłam wrażenie, że wprowadzenie w zagadnienia związane z poznanymi dotąd właściwościami przeciwnowotworowymi pochodnych hydantoiny mogło by być poszerzone. Wiąże się z tym także pewien niedosyt dotyczący informacji na temat wyboru tych 4 właśnie pochodnych do badania: nie wiadomo spośród jakiego panelu pochodnych je wybrano, pochodne o jakich modyfikacjach chemicznych odrzucono itp. Ponadto, wydaje się iż należało także przeprowadzić badania, choćby z wykorzystaniem testu MTT, dla wyselekcjonowanych „negatywnie” przykładowych pochodnych, aby potwierdzić w teście biologicznym poprawność przewidywania bioinformatycznego. W badaniach tych brakuje także wyników dla samej fenytoiny lub innego związku referencyjnego o potwierdzonej aktywności.

Mam także pytanie odnośnie wybranego modelu badawczego. Dlaczego akurat białaczka i chłoniak, jako model badawczy, skoro w mechanizmie działania tych związków miałyby odgrywać rolę napięciowo-zależne kanały sodowe obecne w komórkach raka piersi. Czy zidentyfikowano je także w komórkach wybranych, jako modelowe?

Naukowcy, jak i sama Autorka zwracają uwagę na konieczność dążenia do ograniczania skutków ubocznych nowych leków. Jedną z możliwości wyeliminowania z dalszych badań związków potencjalnie toksycznych, jest ocena ich cytotoksyczności wobec komórek prawidłowych. Czy przeprowadzono takie badania?

W tabeli 1 zaprezentowano IC50 badanych pochodnych. IC50 związku PH2 i PH4 są zbliżone, zarówno względem siebie, jak i są zbliżone porównując obie linie komórkowe ujęte w badaniach. Natomiast związek PH3 jest słabiej aktywny. Do dalszych badań wybrano takie same stężenia dla wszystkich związków, niezależnie od wyznaczonego IC50, a więc 50 μM (tj. zbliżone do IC50 PH2 i PH4 oraz PH3 wobec HL-60) oraz 100 μM (tj. zbliżone do IC50 PH3 wobec U937) – czy doktorantka mogłaby skomentować ewentualny wpływ takiego doboru stężeń na uzyskane wyniki badań i interpretację tych wyników.

Ryc. 27 i 28 – brak odchyień standardowych; ponadto, gdyby wszystkie związki ujęto na jednym wykresie, łatwiej byłoby porównywać je między sobą.

W rozdziale „metody” punkt 2.4 podano, iż zastosowano 0.4% r-r DMSO, jako kontrolny, którego stężenie określono doświadczalnie „aby nie wywierało cytotoksycznego wpływu na komórki leukemiczne”. Czy należy przez to rozumieć, że 0.4% stężenie DMSO zastosowano do rozpuszczenia związków, niezależnie od ich stężenia stosowanego w badaniach?

5. Ocena końcowa:

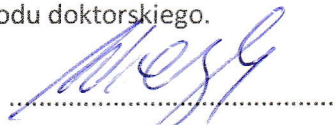
Podsumowując, mgr Katarzyna Śladowska zaprezentowała szeroką charakterystykę nowych pochodnych fenytoiny o potencjalnym zastosowaniu przeciwnowotworowym, dobrze wprowadziła czytelnika w tematykę badawczą, zaprezentowała w sposób czytelny zastosowane metody badawcze i opisała szczegółowo uzyskane, ciekawe wyniki swoich analiz. Zamieszczone uwagi krytyczne nie umniejszają znaczenia tych badań, a mam nadzieję, będą początkiem interesującej dyskusji w czasie obrony tej rozprawy. Badania te uważam za bardzo wartościowe, otwierające drogę do dalszych analiz, zarówno dla chemików opracowujących nowe cząsteczki, jak i dla biologów zastanawiających się nad mechanizmami opisanej przez doktorantkę aktywności tych cząsteczek.

Na tej podstawie ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr **Katarzyny Śladowskiej** spełnia warunki określone w art. 13.1 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 późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie **mgr Katarzyny Śladowskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

16.08.2018

data sporządzenia recenzji



podpis recenzenta