

Prof. dr hab. Michał Pikuła
Profesor, Zastępca Dyrektora Pierwszej Szkoły Doktorskiej GUMed
Pracownia Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej
Zakład Embriologii, Katedra Anatomii, Wydział Lekarski
Gdański Uniwersytet Medyczny (GUMed)
ul. Dębinki 1, 80-210 Gdańsk, bud. CBM, pok. 162
tel. 58 3491368 (bezp.); 58 3491495 (sekretariat)
e-mail: pikula@gumed.edu.pl
www.informator.gumed.edu.pl/339c105

Gdańsk, 11.09.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Pianki pt. „Projektowanie i synteza chemiczna analogów RTD-2 oraz analiza ich aktywności biologicznej wobec linii komórkowych raka piersi”. Recenzja opracowana na zlecenie Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Joanny Pianki pt. „Projektowanie i synteza chemiczna analogów RTD-2 oraz analiza ich aktywności biologicznej wobec linii komórkowych raka piersi” została wykonana w Katedrze Technologii Środowiska, Zespole Analityki i Nanodiagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Gdańskiego oraz Zakładzie Enzymologii i Onkologii Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Adam Lesner, kopromotorem dr hab. Rafał Sądej, prof. uczelni, promotorem pomocniczym dr Natalia Gruba. Recenzowaną pracę stanowi przygotowane w języku polskim klasyczne opracowanie liczące 145 stron. Praca podzielona została na następujące części: przegląd literaturowy (I), cel pracy (II), badania własne (III) podzielone na część syntetyczną (A) oraz badania biologiczne (B), wyniki (IV), podzielone na część syntetyczną (A) oraz część biologiczną (B), podsumowanie i dyskusja (V), wykaz rysunków (VI), wykaz tablic (VII) oraz bibliografia (VIII). W tym miejscu chciałbym nadmienić, że numeracja rozdziałów w spisie treści nie jest w pełni zgodna w numeracją w tekście.

Tematyka pracy dotyczy aktualnie bardzo istotnego problemu poszukiwania nowych, skutecznych leków przeciwnowotworowych. W związku z tym, iż liczba cierpiących na choroby nowotworowe wciąż wzrasta, stanowią one poważny problem nie tylko medyczny, ale również ekonomiczny i społeczny. Większość stosowanych leków przeciwnowotworowych posiada szereg działań niepożądanych. Dodatkowo, ich skuteczność w leczeniu chorób



nowotworowych jest wciąż niewystarczająca. Ogromnym wyzwaniem jest dziś leczenie raka piersi, który u kobiet jest najczęściej występującym nowotworem, jednocześnie najczęstszą nowotworową przyczyną zgonu. Stąd tematyka badań podjęta przez Doktorantkę oraz Promotorów jest niezwykle ważna i aktualna. Peptydy stanowią bardzo obiecującą w medycynie grupę związków o potencjalnie wysokiej aktywności biologicznej. Peptydy RTD należą do grupy teta-defensyn o szerokich właściwościach biologicznych. Stanowią one interesującą grupę związków na podstawie których możliwe jest tworzenie nowych analogów peptydowych o określonych właściwościach biologicznych.

Recenzowana praca doktorska została przygotowana starannie, na wysokim poziomie edytorskim. Przegląd literatury rozpoczynający pracę, stanowi bardzo rozległe wprowadzenie do problematyki pracy doktorskiej. Doktorantka opisała w nim naturalnie występujące peptydy przeciwdrobnoustrojowe, w tym ich strukturę i klasyfikację, mechanizm działania oraz aktywność biologiczną. Kolejno zostały opisane właściwości i występowanie alfa, beta oraz teta defensyn. Autorka bardziej szczegółowo opisała następnie budowę peptydów RTD-2, szczególnie w kontekście ich działania przeciwnowotworowego. Wstęp napisany jest w sposób przejrzysty i logiczny, opierając się na odpowiednim piśmiennictwie. Jedynie na stronie 32 Autorka napisała, że peptydy „RTD-2, powodują proliferację komórek nowotworowych”. Bardzo cenne są zamieszczone we wstępie pracy rysunki obrazujące strukturę peptydów oraz potencjalne mechanizmy ich działania.

Kolejną część pracy stanowią cele pracy doktorskiej. W tym miejscu Autorka przedstawiła również założenia pracy i przesłanki do przeprowadzenia opisywanych badań. Za główne cele pracy Autorka postawiła sobie zaprojektowanie i syntezę analogów RTD-2 oraz ich analizę aktywności wobec komórek nowotworowych raka piersi. Ta część pracy nie budzi większych zastrzeżeń Recenzenta. Jednak moim zdaniem podzielenie tej części na założenia oraz cele pracy z pewnością ułatwiłoby prześledzenie całości pracy. Cele pracy zostały jednak przedstawione klarownie i wynikają z wcześniej opisanych założeń i przeglądu literatury. Kolejny rozdział stanowią „Badania własne” w którym Autorka precyzyjnie opisuje odczynniki chemiczne, aparaturę, metody zastosowane w pracy. Rozdział ten podzielony jest na część syntetyczną oraz badania biologiczne. Warty podkreślenia jest opis zastosowanych w pracy



linii komórkowych (HB2, MDA-MB-231, T47D, SKBR3, MCF-7). Warto również dodać, że linie te reprezentują różne rodzaje raka piersi (linia komórkowa potrójnie ujemnego raka piersi, estrogenozależne linie komórkowe, linia z nadekspresją HER2). Metody wykorzystane w pracy są opisane rzetelnie i w sposób umożliwiający powtórzenie badań. W pracy jednak zabrakło jednoznacznej informacji jaki był skład pożywki podczas stymulacji komórek badanymi związkami. Przede wszystkim, czy w pożywce była obecna surowica bydlęca. Jaki może być wpływ takich warunków inkubacji komórek na uzyskane wyniki. Prosiłbym o wyjaśnienie tej kwestii podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej. Na uwagę zasługuje wykorzystanie w pracy doktorskiej modeli trójwymiarowych 3D. Modele te dużo lepiej naśladują warunki rozwoju tkanki nowotworowej w organizmie niż hodowle konwencjonalne, jednowarstwowe. Przez to uzyskiwane wyniki są bardziej wiarygodne. Przygotowanie tych modeli zostało bardzo dokładnie opisane w niniejszej pracy doktorskiej.

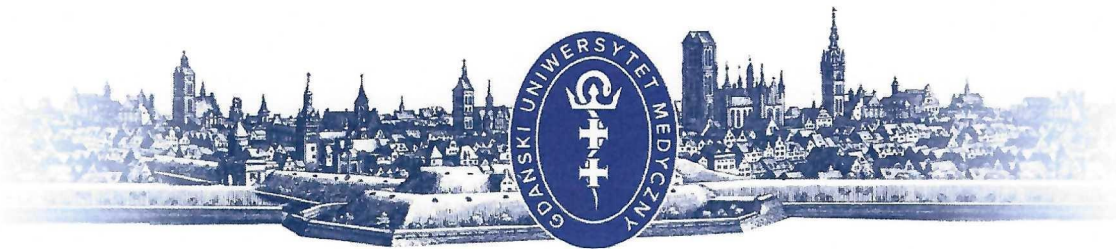
Rozdział „Wyniki” przedstawia w sposób czytelny uzyskane obserwacje oraz wyniki doświadczalne, które zostały podzielone na część syntetyczną oraz część biologiczną. Podczas realizacji pracy zsyntezowano 7 analogów peptydu RTD-2, dodatkowo 2 analogi znakowane fluorescencyjnie oraz 1 peptyd zawierający w łańcuchu dodatkową resztę lizyny, która w łańcuchu bocznym została zmodyfikowana biotyną. Przedstawiono także analizę chromatograficzną (RP-HPLC) oraz spektroskopię mas (MS) uzyskanych analogów RTD-2. Wyniki te przedstawiono w tabeli oraz wykresach MS i RP-HPLC. Zabrakło w mojej opinii podsumowania tych wyników i ich krótkiej interpretacji. W części biologicznej opisano wyniki cytotoxyczności badanych związków wobec wymienionych wcześniej linii komórkowych. Komórki stymulowano związkami w stężeniach 5,0; 25,0 oraz 100 µg/mL. Cytotoxyczność oceniano metodą kolorymetryczną i testem MTT. Hodowle trójwymiarowe traktowano trzema analogami które zostały wcześniej wybrane na podstawie badań cytotoxyczności. Doktorantka przedstawiła również zdjęcia hodowli 3D traktowanych badanymi analogami. W badaniach kontrolę stanowiła linia komórkowa HB2. Warto podkreślać jest, iż w badaniach zastosowano nie tylko syntetyczne analogi peptydów, ale również stosowane w klinice cytostatyki: chlorowodorek doksorubicyny oraz cisplatynę. Wykazano, że analogi peptydowe mogą znacznie zwiększać efektywność działania cytostatyków. Może to mieć ważne znaczenie



kliniczne z wagi na fakt, iż wciąż poszukuje się nowych metod i leków zwiększających skuteczność cytostatyków tradycyjnych (terapię łączone). Rozdział wyniki został przygotowany rzetelnie, dobrano właściwe testy statystyczne, wykorzystano adekwatne metody i techniki badawcze.

Rozdział „Podsumowanie i dyskusja” opisuje najważniejsze wyniki uzyskane w pracy, w tym głównie oceny zahamowania proliferacji linii nowotworowych przez badane związki, penetrację peptydów do wnętrza komórek (mikroskopia fluorescencyjna). Wiele uwagi Doktorantka poświęciła interpretacji wyników spektroskopii mas, zwracając uwagę na różnice w poziomach wybranych wewnątrzkomórkowych białek w komórkach traktowanych peptydami. Co ważne, wykazano, że białka wchodzące w interakcję z peptydami związane są proteosomalną degradacją białek, co może mieć potencjalne znaczenie kliniczne. Doktorantka opisała również jakie badania są wskazane w kolejnych projektach by pogłębić informacje na temat wpływu analizowanych peptydów na komórki nowotworowe. Doktorantka zwróciła uwagę na potrzebę opisanego dokładnego mechanizmu działania analizowanych związków. Wnioski zostały wyciągnięte poprawnie i odpowiadały one postawionym celom. Chciałbym jednak dodać, iż dla pełnej przejrzystości i logiki pracy warto byłoby rozdzielić podsumowanie wyników od wniosków. Dyskusja pracy została poprowadzona rzetelnie i świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Jednak mało w mojej opinii poświęcono uwagi zastosowanym modelom komórkowym. Szczególnie ważnym elementem do rozwinięcia w dyskusji, jest kwestia linii komórkowej HB2 stanowiącej kontrolę dla linii nowotworowych. Komórki HB2 stanowią linię nieśmiertelnioną, która może reagować odmiennie od komórek zdrowych (nietransformowanych).

Wykazy rysunków (42 rysunki) oraz tabel (11 tabel) zostały przygotowane starannie. Dobór piśmiennictwa liczącego 199 pozycji bibliograficznych został przygotowany odpowiednio i nie budzi zastrzeżeń. Wykorzystanie bogatej i szerokiej literatury wskazuje, iż Autorka rozprawy swobodnie porusza się w zakresie prowadzonych badań naukowych dotyczących zarówno części chemicznej, jak również biologicznej. Większość cytowanych prac pochodzi z ostatnich 10 lat.



Całość pracy oceniam bardzo wysoko, zwracając uwagę, że wnosi ona znaczący wkład w rozwój chemii i biotechnologii medycznej. Wszystkie poruszone przeze mnie zastrzeżenia i uwagi nie wpływają znacząco na ogólną bardzo pozytywną ocenę recenzowanej pracy doktorskiej. Warta podkreślenia jest również interdyscyplinarność pracy, owocna współpraca Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego oraz Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed, jak również współpraca z Zakładem Biofizyki Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

Podsumowując stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Pianki pt. „Projektowanie i synteza chemiczna analogów RTD-2 oraz analiza ich aktywności biologicznej wobec linii komórkowych raka piersi” spełnia ustawowe oraz zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jednocześnie może mieć w przyszłości znaczenie praktyczne i kliniczne. W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Joanny Pianki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Michał Pikuła

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ LEKARSKI
Katedra Anatomii, Zakład Embriologii
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1
tel. 058 349 14 95, fax 058 349 14 95
e-mail: embriologia@gumed.edu.pl