



Poznań, 29.03.2019 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr. Karola Jarocho

**pt. „Badania cytotoksyczności i metabolizmu kombretastatyny A4 oraz analizy
metabolomiczne linii komórkowych z wykorzystaniem nowatorskich metod
mikroekstrakcyjnych”**

wykonanej w Katedrze Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum w Bydgoszczy
promotor: dr hab. n. farm. Barbara Bojko

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi spójny tematycznie cykl publikacji dotyczących analizy działania cytotoksycznego i metabolizmu kombretastatyny A4 oraz profilu metabolomicznego ludzkiej linii komórkowej niedrobnokomórkowego raka płuc A-549 z wykorzystaniem mikroekstrakcji do fazy stałej (ang. Solid Phase Microextraction).

Temat rozprawy doktorskiej jest nowatorski, ponieważ- pomimo wielu badań dotyczących aktywności biologicznej kombretastatyny A4- nadal brakuje danych literaturowych na temat biotransformacji tego związku oraz metod wykorzystywanych do analiz metabolomicznych w modelu raka płuc. Według mojej wiedzy publikacje oryginalne składające się na cykl rozprawy doktorskiej stanowią jedne z pierwszych doniesień literaturowych podejmujących powyższe zagadnienie.

Praca doktorska liczy 87 stron i obejmuje spis treści, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, wykaz publikacji stanowiących podstawę do nadania stopnia naukowego doktora, spis publikacji poza cyklem, przedruki czterech publikacji składających się na rozprawę doktorską, podsumowanie, wnioski, oświadczenia współautorów zawierających informacje

o charakterze ich udziału, streszczenie w języku polskim i w języku angielskim oraz spis piśmiennictwa.

Tytuł rozprawy doktorskiej odpowiada tematyce załączonych publikacji; są to cztery prace (dwie pogładowe oraz dwie oryginalne) z lat 2016-2019, opublikowane w czasopismach ze współczynnikiem oddziaływania IF (ang. *impact factor*): *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *Pharmacological Reports*, *Scientific Reports* oraz *Talanta* o łącznej wartości IF=13,784 i sumarycznej liczbie punktów MNiSW=140. Należy podkreślić, że Doktorant jest pierwszym autorem prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Jego wkład autorski jest znaczący, co znalazło potwierdzenie w oświadczeniach współautorów, które zostały zawarte na końcu rozprawy. Z oświadczeń współautorów prac składających się na rozprawę doktorską wynika, że mgr Karol Jaroch był nie tylko głównym badaczem, ale odegrał też wiodącą rolę w zaplanowaniu doświadczeń będących przedmiotem tych publikacji, analizie wyników oraz przygotowaniu manuskryptów.

Prace badawcze, które składają się na rozprawę doktorską zostały wcześniej pozytywnie ocenione przez redakcje czasopism i niezależnych recenzentów, co potwierdza, że badania zostały prawidłowo zaplanowane i przeprowadzone przez mgr. Karola Jarocha.

Metodyka i wyniki zawarte w pracach składających się na cykl rozprawy doktorskiej merytorycznie nie budzą żadnych zastrzeżeń. Co więcej, w pełni zrealizował cel badawczy, który nakreślił sobie Doktorant we *Wstępie* do pracy.

Pierwsza publikacja z tego cyklu (str. 10-25) dotyczy wykorzystania hodowli komórkowych w kontekście ekstrapolacji *in vitro-in vivo*. W powyższej pracy pogładowej Doktorant bardzo trafnie ujął zagadnienie modelowania farmakokinetycznego opartego o fizjologię (ang. Physiologically Based Pharmacokinetic, PBPK), do którego przeprowadzenia niezbędne są dane uzyskane w części eksperymentalnej *in vitro*. Mgr Karol Jaroch umiejętnie scharakteryzował następnie modele doświadczalne *in vitro* wykorzystywane do oceny wchłaniania, rozmieszczenia, metabolizmu i wydalania (ang. Absorption, Distribution, Metabolism, Extraction, ADME) związków chemicznych. Doktorant zwraca uwagę czytelnika na, wciąż niestety rzadko wykorzystywany, model 3D hodowli komórek, która ma na celu znacznie bardziej wiarygodne odwzorowanie warunków panujących w organizmie w stosunku do tradycyjnego, najczęściej stosowanego w eksperymentach *in vitro* modelu 2D. Hodowle trójwymiarowe wykazują dużo większe podobieństwo do tkanki pod względem kontaktów międzykomórkowych, ścieżek sygnałowych, ekspresji genów oraz dystrybucji składników odżywczych i tlenu. W mojej opinii jest to szczególnie cenny aspekt omawianej publikacji dotyczącej zagadnienia

ekstrapolacji *in vitro-in vivo*. Podsumowując, chciałabym podkreślić aktualność i użyteczność podjętej przez Doktoranta tematyki, ponieważ rozwój badań *in silico* oraz *in vitro* wpływa znacząco na redukcję liczby zwierząt wykorzystywanych w doświadczeniach, co wpisuje się w nurt badań projektowanych zgodnie z regułą 3R (ang. Replacement, Reduction, Refinement).

W ramach drugiej publikacji (str. 28-37) scharakteryzowano związki z grupy kombretastatyn, które po raz pierwszy zostały wyizolowane z kory wierzby afrykańskiej pod koniec lat 80-tych. Doktorant opisał mechanizm działania kombretastatyn oraz analizę zależności pomiędzy ich strukturą a aktywnością biologiczną. Dane te uzupełnił o badania kliniczne fosforanu kombretastatyny A1 i A4. Uważam, że powyższa praca pogładowa stanowi dla czytelnika wartościowe wprowadzenie do prac oryginalnych włączonych do cyklu rozprawy doktorskiej.

Badania przeprowadzone w ramach trzeciej publikacji (str. 46-54) obejmowały analizę metabolomiczną związków zewnątrzkomórkowych wydzielanych do medium hodowlanego. Doktorant trafnie dokonał wyboru linii komórkowej raka płuc, podkreślając, że komórki A-549 były wykorzystane, jak dotąd, tylko do oceny lotnych związków organicznych za pomocą metody Headspace SPME (HS-SPME), co potwierdza Jego bardzo dobrą znajomość literatury z badanego zakresu. W celu wykonania analizy metabolomicznej wykorzystano dwa protokoły ekstrakcyjne oparte o SPME-LC-MS. W wyniku aplikacji pierwszego protokołu wytypowano L-argininę oraz neurynę jako związki różnicujące komórki inkubowane z kombretastatyną A4 od komórek kontrolnych. Drugi z zastosowanych protokołów pozwolił na wyselekcjonowanie trzech związków: palmitamidu, lumichromu oraz L-homofenylalaniny. Uzyskane wyniki pokazują możliwość wykorzystania mikroekstrakcji do fazy stałej w analizach hodowli komórkowych, co pozwala na uzyskanie informacji o zmianie metabolizmu na poziomie biochemicznym. Ponadto wykorzystanie włókien o różnej długości pokrycia fazą ekstrakcyjną (2 mm oraz 8 mm) w omawianych dwóch protokołach wskazuje na elastyczność tej metody. W podsumowaniu Doktorant stwierdza, że zastosowana przez Niego metoda charakteryzuje się niską inwazyjnością ekstrakcji, co umożliwia wykonanie innych oznaczeń na tych samych komórkach. Mgr Karol Jaroch sformułował powyższy wniosek na podstawie przeprowadzonych po ekstrakcji analiz cytotoksyczności. W tym miejscu, chciałabym zaznaczyć, że uwzględnienie wyników dotyczących działania cytotoksycznego kombretastatyny A4 w powyższej publikacji dałoby pełniejszy obraz omawianej tematyki. Chciałabym również prosić o uzasadnienie wyboru przez Doktoranta testu SRB do oceny żywotności komórek A-549 pod wpływem związku badanego.

W publikacji czwartej (str. 57- str. 66) mgr Karol Jaroch przeprowadził analizę metabolizmu kombretastatyny A4, w wyniku której potwierdzono, że główną ścieżką jej biotransformacji jest O-demetylacja i aromatyczna hydroksylacja. Chciałabym podkreślić, że w wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano aż 14 struktur metabolitów, z których osiem zostało po raz pierwszy opisane przez Doktoranta. Nie stwierdzono w nich różnic w zależności od zastosowanej metody: precypitacji białek czy SPME. Uważam, że Doktorant trafnie sformułował wnioski sugerując, że mikroekstrakcja do fazy stałej może być z powodzeniem wykorzystywana do badań metabolizmu w modelu *in vitro* m.in. z powodu braku różnic względem metody precypitacji białek oraz wydajniejszego oczyszczenia próbki i możliwości oceny analizy w czasie.

W streszczeniu (wersji polsko- i anglojęzycznej) Doktorant zawarł podsumowanie zagadnień w omawianych publikacjach oraz wnioski z przeprowadzonych badań, które są poprawnie sformułowane.

Z obowiązku recenzenta muszę wymienić uchybienia takie jak błędy literowe czy interpunkcyjne. Uwagi te oczywiście nie wpływają na pozytywną ocenę merytoryczną recenzowanej pracy.

W podsumowaniu, należy stwierdzić, iż Doktorant wykazał się dużą samodzielnością naukową i umiejętnością wyciągania z przeprowadzonych analiz poprawnych wniosków. Pragnę również podkreślić, że praca doktorska charakteryzuje się trafnością wyboru tematu. W analizowanym cyklu publikacji mgr. Karola Jarocha doświadczenia zostały poprawnie zaplanowane i wykonane, a uzyskane wyniki przyczyniają się do lepszego poznania omawianej tematyki. Dlatego też, praca doktorska stanowi cenne uzupełnienie dostępnego piśmiennictwa naukowego, stanowiąc zarazem podstawę do kontynuowania badań w tej tematyce.

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr. Karola Jarocha spełnia wszystkie ustawowe warunki i kryteria, jakim powinna odpowiadać praca na stopień doktora nauk farmaceutycznych. Zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy o dopuszczenie mgr. Karola Jarocha do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Henka Piotrowska-Kempisty

29.03.2019r.