



UNIwersytet Medyczny
w Białymstoku
CENTRUM BADAŃ KLINICZNYCH
15-276 Białystok, ul. M. Skłodowskiej-Curie 24a
tel. 85 831 81 50

dr hab. Michał Ciborowski

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Centrum Badań Klinicznych

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Karola Jarocho pt.: *„Badania cytotoksyczności i metabolizmu kombretastatyny A4 oraz analizy metabolomiczne linii komórkowych z wykorzystaniem nowatorskich metod mikroekstrakcyjnych”* wykonanej pod kierunkiem dr hab. n. farm. Barbary Bojko.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska dotyczy opracowania metodyki opartej o mikroekstrakcję do fazy stałej (SPME) w celu analizy zmian metabolomicznych hodowli komórkowych *in vitro*. Przedmiotem badań była linia niedrobnokomórkowego raka płuca – A549, traktowana kombretastatyną A4 (CA4). Ponadto oceniono metabolizm CA4 przeprowadzając m.in. badania na szczurzych mikrosomach również przy zastosowaniu SPME. W obu badaniach, do oznaczeń wykorzystana została chromatografia cieczowa sprzężona z wysokorozdzielczą spektrometrią mas. Połączenie ekstrakcji próbki przy pomocy SPME z analizą wielkoskalową, jaką jest metabolomika, to nowoczesny sposób prowadzenia badań naukowych. Rozwój SPME w badaniach biomedycznych ma m.in. kluczowe znaczenie ze względów etycznych. Technika ta dzięki swojej niskiej inwazyjności skutecznie przyczynia się do ograniczenia liczby zwierząt w badaniach *in vivo*. Ponadto umożliwia prowadzenie badań z kilkukrotnym wykorzystaniem tego samego osobnika. Natomiast w przypadku badań na hodowlach komórkowych, SPME umożliwia wielokrotną analizę tej samej próbki w czasie lub wykonanie innych oznaczeń na tych samych komórkach. Podjęty temat badań jest również istotny ze względów medycznych. Niedrobnokomórkowy rak płuca stanowi ok. 80% przypadków wszystkich pierwotnych nowotworów układu oddechowego, które przyczyniają się do największej liczby zgonów chorych na złośliwe nowotwory. Kombretastatyna A4 oraz jej prolek w postaci fosforanu to związki o działaniu przeciwnowotworowym, będące obecnie przedmiotem wielu badań klinicznych, w tym dotyczących leczenia niedrobnokomórkowego raka płuca. W związku z powyższym, poznanie mechanizmu działania CA4 na komórki niedrobnokomórkowego nowotworu płuca oraz identyfikacja produktów metabolizmu tego związku, to tematy ważne i aktualne.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa liczy 87 stron i ma charakter nowatorski, składając się z powiązanego cyklu 4 publikacji (2 prace poglądowe i 2 oryginalne) o łącznej liczbie 140 punktów MNiSW i łącznym wskaźniku Impact Factor równym 13,874. We wszystkich publikacjach mgr Karol Jaroch jest pierwszym autorem, a w jednej z nich również autorem korespondencyjnym. Treść rozprawy podzielona jest na 8 części, które poprzedza spis treści oraz wykaz stosowanych skrótów. We wstępie Autor przytacza korzyści płynące z prowadzenia badań *in vitro* oraz *in silico*, które pozwalają na ograniczenie liczby zwierząt wymaganych do przeprowadzenia badania, oraz wspomina o konieczności wprowadzania takich procedur, które zredukują stopień cierpienia zadawanego zwierzętom laboratoryjnym. Jak podaje Autor, właśnie w tym ostatnim aspekcie kluczowe jest wykorzystanie techniki SPME do pobierania od zwierząt materiału do badań, gdyż metoda ta charakteryzuje się niską inwazyjnością oraz umożliwia prowadzenie eksperymentów z kilkukrotnym wykorzystaniem tego samego osobnika. W dalszej części wstępu Autor przedstawia charakterystykę związków z grupy kombretastatyn skupiając się na ich pochodzeniu, budowie oraz mechanizmie działania na komórki nowotworowe. Ostatnia część wstępu poświęcona jest mikroekstrakcji do fazy stałej. Autor przedstawia atuty tej techniki w porównaniu do innych metod ekstrakcji, wskazując również na jej przydatność w badaniach metabolomicznych oraz metabolizmu, gdyż zastosowanie SPME pozwala na jednoczesną ekstrakcję metabolitów z natychmiastowym hamowaniem reakcji enzymatycznych. Zagadnienia związane z wykorzystaniem hodowli komórkowych w badaniach ukierunkowanych na odkrywanie nowych leków oraz z właściwościami kombretastatyn zostały szczegółowo przedstawione w pracach poglądowych będących częścią rozprawy doktorskiej.

W kolejnym rozdziale sformułowany jest jasny i zrozumiały cel pracy, który jest podzielony na cel główny oraz trzy wypunktowane cele szczegółowe.

Następny rozdział zatytułowany jest „Cykl publikacji będący podstawą rozprawy doktorskiej”. W rozdziale tym Autor wskazuje publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz jedną publikację poglądową spoza cyklu, która omawia wykorzystanie techniki SPME w medycynie translacyjnej i badaniach nad nowymi lekami, a mgr Karol Jaroch jest jej współautorem. Dalsza część tego rozdziału poświęcona jest badaniom własnym, które są zebrane w dwóch podrozdziałach, każdy poświęcony danej pracy oryginalnej. Mam jedną uwagę techniczną do tego rozdziału. Moim zdaniem, lista publikacji powinna znaleźć się na początku rozprawy doktorskiej, zaraz po spisie treści, natomiast podrozdziały poświęcone pracom oryginalnym powinny być oddzielnymi rozdziałami umiejscowionymi bezpośrednio po celu pracy.

Pierwszy podrozdział poświęcony pracy badawczej zatytułowany jest „Analiza cytotoksyczności kombretastatyny A4 z wykorzystaniem modelu linii komórkowej niedrobnokomórkowego raka płuc A549”. W badaniach opisanych w tej części pracy, mgr Karol Jaroch testował różne protokoły ekstrakcyjne (ekstrakcja w naczynku chromatograficznym lub w płytce wielodołkowej) badając jednocześnie wpływ podania kombretastatyny A4 lub fosforanu kombretastatyny A4 na zmiany w związkach zewnątrzkomórkowych wydzielanych do medium hodowlanego przez komórki niedrobnokomórkowego raka płuca. Po przeprowadzeniu obu metod ekstrakcji Autor uzyskał podobną liczbę unikalnych wartości stosunku masy do ładunku (m/z) w badanych próbkach, co wskazuje na możliwość wykorzystania SPME w analizie hodowli komórkowej bezpośrednio w płytkach wielodołkowych. Ponadto, jak podaje Autor, przy odpowiedniej optymalizacji SPME nie wyczerpuje złoża matrycy biologicznej, co umożliwia prowadzenie badań zależności w czasie z tej samej próbki, a po zakończeniu ekstrakcji wykonanie innych oznaczeń na tych samych komórkach. Badania wpływu kombretastatyny A4 i jej fosforanu na metabolizm komórek nowotworowych pozwoliły Autorowi zaobserwować zmiany w takich metabolitach jak L-arginina, neuryna, palmitamid, lumichrom oraz L-homofenyloalanina.

W drugim podrozdziale przedstawiona jest analiza metabolizmu kombretastatyny A4 z wykorzystaniem różnych metod badawczych. W celu oceny metabolizmu CA4, Autor przeprowadził wielokierunkowe badania składające się m.in. z obliczeń *in silico*, reakcji elektrochemicznych czy też przeprowadzając oznaczenia na szczurzych enzymach mikrosomalnych wykorzystując m.in. technikę SPME. W wyniku przeprowadzonych badań mgr Karol Jaroch zaproponował czternaście struktur metabolitów CA4, z których jedynie sześć było wcześniej opisanych przez innych autorów. Ponadto, wykonane badania pozwoliły Autorowi na wskazanie głównej ścieżki metabolizmu kombretastatyny.

Uzyskane wyniki badań mgr Karol Jaroch podsumowuje w rozdziale 4, a wyciągnięte wnioski przedstawia w trzech punktach w kolejnym rozdziale. Są one klarowne i w sposób rzeczowy odpowiadają na postawione cele pracy. Autor zauważa, że wykorzystanie mikroekstrakcji do fazy stałej jako techniki analitycznej umożliwia prowadzenie analiz metabolomicznych próbek biologicznych, co jest zwłaszcza przydatne gdy ilość materiału do badań jest ograniczona. Ponadto wskazuje, że kombretastatyna A4 oraz jej prolek wykazują efekt biologiczny względem linii nowotworowej niedrobnokomórkowego raka płuca, a głównym szlakiem metabolizmu CA4 jest demetylacja oraz hydroksylacja.

W dalszej części zebrane są oświadczenia wszystkich współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy określające ich indywidualny wkład w powstanie tych prac. Następnie przedstawione są streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim, a na końcu znajduje się spis piśmiennictwa. Wyszczególnionych jest w nim tylko 5 pozycji, jednak każdej z publikacji wchodzących w skład rozprawy towarzyszy spis wykorzystanej literatury. I tak, przygotowując prace poglądowe Autor posiłkował się odpowiednio 111 i 60 publikacjami naukowymi, zaś w pracach badawczych uwzględnionych jest 29 i 24 pozycji literaturowych.

Podsumowując uważam, iż w przedłożonej mi do oceny rozprawie wykorzystane zostały nowatorskie metody badawcze, które zostały dobrane adekwatnie do założonych celów badawczych. Spektrum zastosowanych metod, uwzględniające techniki *in silico* i *in vitro*, wskazuje na szeroki warsztat badawczy mgr Karola Jarocho. Uzyskane wyniki poszerzają naszą wiedzę odnośnie wpływu kombretastatyny na komórki niedrobnokomórkowego raka płuca oraz szlaków metabolizmu tego leku. Rozprawa została bardzo dobrze przygotowana pod względem edytorskim. Drobna uwaga to błąd w skrócie metody ekstrakcji ciecz-ciecz, która jest nazwana LEE, zamiast LLE od angielskiego liquid-liquid extraction. Błędny skrót znajduje się w liście skrótów oraz w jednym miejscu na stronie 38. W dalszej części rozprawy jest już stosowany skrót LLE. Ponadto na stronie 27 powinno być „Zagadnienia związane z właściwościami kombretastatyn...” zamiast „Zagadnienia związane z właściwościami kombretastatynami...”, a na stronie 43 „...dlatego istotnym elementem rozwoju badań opartych o linie komórkowe...” zamiast „...dlatego istotnym elementem rozwoju badań opartych o linie komórkowej...”. Jednak wymienione błędy edytorskie, jak również pozostałe uwagi znajdujące się w recenzji nie podważają wartości merytorycznej przeprowadzonych badań i znaczenia uzyskanych wyników.

Biorąc pod uwagę całość rozprawy doktorskiej stwierdzam, iż spełnia ona warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz. 882 z późn. zm.). Wnioskuje zatem do Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy o przyjęcie niniejszej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Karola Pawła Jarocho do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Białystok, dn. 25.03.2019 r.

Załącznik: Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej.

dr hab. Michał Ciborowski