



Poznań 04.02.2022

RECENZJA

Pracy doktorskiej Pani mgr Marta Orlickiej-Płockiej pt.: „Mechanizm działania oraz właściwości proapoptotyczne rybozydu kinetyny i jego pochodnych w komórkach nowotworowych” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Elizy Wyszko i promotora pomocniczego dr Agnieszki Fedoruk-Wyszomirskiej w Pracowni Analiz Struktur Subkomórkowych Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.

Tematyka, która została podjęta w rozprawie doktorskiej Pani mgr Marty Orlickiej-Płockiej została poświęcona ciągle bardzo aktualnym zagadnieniom poszukiwania nowych strategii terapeutycznych, które mogą zostać użyte w leczeniu chorób nowotworowych. Z uwagi na fakt, że choroby nowotworowe stanowią drugą główną przyczynę śmierci w krajach wysoko rozwiniętych podjęty przez Doktorantkę temat wydaje się być szczególnie istotny. W laboratoriach na całym świecie poszukiwane są związki chemiczne umożliwiające uzyskanie maksymalnego efektu terapeutycznego przy akceptowalnych dla pacjenta efektach ubocznych. Obecnie największe nadzieje budzą strategie zaprojektowane tak aby selektywnie blokować kluczowe dla przetrwania komórek nowotworowych szlaki przekazywania sygnałów lub szlaki metaboliczne. Takie strategie, precyzyjnie skupione na wybranych celach molekularnych i szlakach sygnalizacyjnych lub metabolicznych wydają się być szczególnie interesujące i cenne z punktu widzenia ich zastosowania w klinice co więcej są one również interesujące z punktu widzenia badań podstawowych zmierzających do jeszcze lepszego poznania biologii komórek nowotworowych. W swoich poszukiwaniach Doktorantka przyjrzała się lekom i strategiom terapeutycznym biorącym za cel metabolizm komórek nowotworowych ze szczególnym uwzględnieniem metabolizmu nukleotydów purynowych oraz prób jego zakłócania za pomocą precyzyjnie zaprojektowanych związków małowcząsteczkowych. Pomimo, że w swojej pracy Autorka postanowiła posłużyć się, jako modelem hodowlami in vitro to wydaje się, że tak doskonale przemyślana ingerencja w wewnątrzkomórkowe szlaki metaboliczne z wysokim prawdopodobieństwem może okazać się skuteczna także w warunkach in vivo.

Dysertacja ma typowy układ, rozpoczyna się od spisu treści, wstępu, i celu pracy, opisu użytych materiałów i zastosowanych metod, omówienia wyników, dyskusji, podsumowania, wykazu schematów, rysunków i tabel oraz bibliografii. Streszczenie oraz wykaz skrótów są umieszczone na początku pracy.

Wstęp

W bardzo obszernym, liczącym niespełna 70 stron wstępie autorka przybliży czytelnikowi większość kwestii niezbędnych do zrozumienia zagadnień poruszanych w pracy. W tym rozdziale wskazane są zalety ale także problemy związane z zastosowaniem związków małowcząsteczkowych w terapiach przeciwnowotworowych. Autorka przedstawiła krótki rys historyczny zastosowania antymetabolitów w leczeniu chorób nowotworowych aby płynnie przejść do będącego przedmiotem rozprawy rybozydu kinetyny i jego wpływu na metabolizm nukleozydów purynowych. Konsekwentnie, w następnych podrozdziałach omówione zostały szczegółowo aspekty jego regulacji w prawidłowych komórkach ssaków oraz w komórkach nowotworowych. W rozdziale tym omówione zostały również tzw. szlak rezerwowy oraz szlak biosyntezy puryn do nowo. We wstępie do swojej pracy Autorka opisała również zagadnienia związane z metabolizmem i bioenergetyką komórek nowotworowych. W tym kontekście Doktorantka przedstawiła również podstawowe informacje związane z mechanizmami śmierci komórkowej w tym z apoptozą autofagię i mitofagią. W rozdziale tym, czytelnik znajdzie również informacje dotyczące wpływu związków małowcząsteczkowych na status oksydacyjny komórek ze szczególnym uwzględnieniem glejaka wielopostaciowego, a przy tej okazji Autorka przedstawiła podstawowe informacje dotyczące reaktywnych form tlenu oraz roli jaką pełnią one w procesach związanych ze śmiercią komórek zarówno nowotworowych jak i prawidłowych. Ważny w kontekście zrozumienia modelu eksperymentalnego zastosowanego przez Autorkę jest bez wątpienia również rozdział poświęcony hodowlom komórkowym. Autorka opisuje tutaj zalety coraz częściej stosowanych w hodowlach komórkowych modeli 3D. W niniejszej pracy Autorka posługuje się modelem sferoidów klasyfikowanym jako model pozbawiony rusztowań (non scaffold based) i być może dlatego ogranicza się ona głównie do sferoidów opisując modele 3D, pomijając coraz szybciej zdobywające rynek tego typu produktów modele 3D bazujące na wszelkiego rodzaju rusztowaniach (tzw scaffold based), które być może, mogłaby być też interesujące dla czytelnika tej pracy. Podsumowując tą część rozprawy doktorskiej można bez cienia wątpliwości stwierdzić, że rozdział otwierający omawianą dysertację doskonale spełnia, swoje zadanie wprowadzenia do podejmowanych w niej problemów badawczych tym bardziej, że informacje zawarte w tym rozdziale, co należy tutaj zdecydowanie podkreślić, są poparte doskonale dobranym piśmiennictwem. Ponadto co równie zdecydowanie należy zaakcentować zamieszczone w tym rozdziale niezwykle czytelne łatwe zrozumienia i mówiąc otwarcie bardzo ładne ryciny, doskonale obrazują omawiane we wstępie zagadnienia.

Cel pracy

Ten rozdział, co jest typowe w tego typu pracach w bardzo skondensowanej formie przedstawia ponownie całą koncepcję dysertacji oraz w sposób zwięzły i przekonujący uzasadnia podjęcie przeprowadzonych przez Doktorantkę eksperymentów oraz dobór zastosowanych metod badawczych. Nietypowe jest rozszerzenie tego rozdziału o informację o poszczególnych etapach powstawania pracy a także o publikacjach które zawierają w sobie część wyników opisywanych w niniejszej pracy.

Metodyka

Metodyka badań jest bardzo dobrze opisana i z pewnością może być pomocna dla każdego, kto chciałby przeprowadzić podobne doświadczenia ponieważ podane są tu chyba wszystkie niezbędne

detale metodyczne. Na uwagę zasługuje szeroki wachlarz nowoczesnych metod wymagających nie tylko zastosowania zaawansowanej technologicznie aparatury ale także umiejętności jej obsługi i interpretacji wyników. Spośród zastosowanych metod wymienię tylko cystometrię przepływową, mikroskopie konfokalną czy chromatografię HPLC-DAD-ESI/MS. Również tutaj niektóre z zastosowanych metod są zilustrowane niezwykle estetycznymi i zrozumiałymi już na pierwszy rzut oka schematami głównie przygotowanymi w serwisie Biorender.

Wyniki

Wyniki opisane są a 75 stronach co już samo w sobie mogłoby świadczyć ogromie pracy wykonanej przez doktorantkę, chciałbym jednak zwrócić uwagę również niezwykle staranną i przemyślną prezentację wyników. Nie mamy tutaj do czynienia, jak to czasami bywa, z opisem mówiący jedynie o wzroście lub spadku jakiegoś parametru. Ryciny składają się z dobrze skomponowanych wykresów zarówno „klasycznych” wykresów obrazujących wartości zmierzone w poszczególnych eksperymentach jak chromatogramów, widm masowych, zdjęć z mikroskopu konfokalnego czy prążków Western blot. Tak skomponowane zestawy rycin pozwalają na kompleksową ocenę opisywanego parametru która w wielu przypadkach dodatkowo ułatwiana jest przez rysunki uzupełniające zamieszczone przez Autorkę jako dodatkowy element wspierający przekaz uzyskany w drodze eksperymentów właściwych. Ponadto uwagę zwracają opisy wyjaśniające zasadność wykonania poszczególnych doświadczeń oraz dobór warunków w każdym z nich. Wszystko to jest poparte zarówno wynikami wstępnymi danymi literaturowymi czy też specyfiką wykorzystywanej metody badawczej. Uzyskane wyniki są w większości przypadków opatrzone zwięzłym ale niezwykle trafnym komentarzem co sprawia, że czytanie tej części rozprawy doktorskiej jest, zresztą tak jak lektura jej całości jest po prostu przyjemnością.

Dyskusja

Podzielona jest na 3 rozdziały dotyczące odpowiednio wpływu rybozydu kinetyny na metabolizm puryn, wpływu rybozydu kinetyny na funkcjonowanie mitochondriów oraz na produkcję reaktywnych form tlenu w komórkach glejaka wielopostaciowego. Ten rozdział sprawia podobnie jak cała reszta pracy bardzo dobre wrażenie. W rozdziale niespełna liczącym niespełna 36 stron Autorka konfrontuje wyniki przeprowadzonych przez siebie eksperymentów z danymi literaturowymi w kontekście 3 w/w wymienionych obszarów których dotyczyły eksperymenty. Autorka umiejętnie prowadzi narrację popierając bardzo umiejętnie cytując poszczególne ryciny zamieszczone w sekcji wyniki oraz odnośniki literaturowe. Na odnotowanie zasługuje opis alternatywnej do mikroskopii fluorescencyjnej metody wykrywania obecności i aktywności purynosomów za pomocą cytometrii przepływowej a także pokazano też, w jaki sposób tak specyficzny związek jak, rybozydu kinetyny, wpływa na aktywację purynosomu.

Wnioski

Tak jak można się było spodziewać w tak obszernej i dotyczących wielu odległych od siebie aspektów pracy Autorka postarała się o syntetyczne podsumowanie uzyskanych wyników badań. W końcowej części pracy zamieszczono rozdział zatytułowany „Podsumowanie” zawierający 21 wniosków i obserwacji będących wynikiem analizy wyników uzyskanych w pracy i ich zestawienia z danymi dostępnymi w piśmiennictwie naukowym. Został on podzielony na część ogólną oraz części poświęcone wpływowi rybozydu kinetyny na metabolizm puryn oraz wpływowi rybozydu

kinetyny na mitochondria i metabolizm komórek nowotworowych. Większość z wniosków i obserwacji zamieszczonych w tym rozdziale zwiiera odniesienie do podrozdziałów z sekcji Wyniki gdzie czytelnik może się dokładniej zapoznać z rezultatami doświadczeń, które legły u podstaw wniosków sformułowanych przez Autorkę. Zabieg ten z jednej strony pozwala na sformułowanie wniosków, które wydają się być bardzo ogólne a zamieszczenie w/w odnośników wręcz zachęca czytelnika do przypominania sobie szczegółowych wyników eksperymentów opisanych przez Autorkę. Z drugiej strony wnioski mogłyby być tutaj bardziej precyzyjne i tak np. punkt 9 jest przykładem konkluzji nie są wystarczająco precyzyjnej, a ponowna lektura danych zamieszczonych w punkcie 4.1 też może nie przynieść w krótkim czasie wystarczająco szczegółowych informacji potwierdzających stawianą tam tezę.

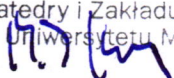
Piśmiennictwo, streszczenia

Pracę zamyka lista piśmiennictwa zawierająca 333 pozycje. Piśmiennictwo jest bardzo dobrze dobrane, aktualne, w całości anglojęzyczne i prawidłowo uporządkowane. Praca zawiera też streszczenie ale tylko w języku polskim.

Aspekty formalne i edytorskie

Pod tym względem podobnie jak pod względem merytorycznym praca przygotowana jest perfekcyjnie, trudno jest doszukać literówek (znaleziono 1 jedną literówkę na stronie 193), błędów stylistycznych niefortunnych przekładów z języka angielskiego, czy określeń, żargonowych. Praca jest przygotowana perfekcyjnie a całości dobrego wrażenie dopełniają ryciny będące doskonałym przykładem jak szerokie możliwości dają obecnie serwisy takie jak wspomniany wyżej Biorender.

W podsumowaniu uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi systemowe i kompleksowe rozwiązanie postawionego przez Doktorantkę problemu badawczego i świadczy o dojrzałości naukowej Pani mgr Marty Orlickiej-Płockiej. W pracy zostały podjęte problemy bardzo istotne zarówno z punktu widzenia terapii chorób nowotworowych jak i z punktu widzenia rozwoju nauk podstawowych. Należy podkreślić, że w pracy zastosowano szereg metod wymagających od pracującej przy jej użyciu osoby zarówno zrozumienia zasady działania danej metody jak i interpretacji danych oraz łączenia ich w szerszy obraz dotyczący całości zagadnienia którego rozwiązania podjęła się Doktorantka. Z tego zadania pani mgr Marta Orlicka-Płocka wywiązała się wzorowo dostarczając zarówno wnikliwe analizy uzyskanych danych w poszczególnych eksperymentach jak i umiejętnie wpasowując uzyskane wyniki w gąszcz danych dostępnych już dotychczas w piśmiennictwie naukowym. Biorąc pod uwagę powyższe argumenty oceniam pracę bardzo wysoko i wnoszę o jej wyróżnienie. Spełniając wymóg stawiany przed tego rodzaju recenzjami z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) wnoszę, zatem wniosek do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Marty Orlickiej-Płockiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Katedry i Zakładu Toksykologii
Uniwersytetu Medycznego

Prof. dr hab. Marek Murias