

Kraków, 28.07.2022

UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE



Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Farmaceutycznej
30-688 Kraków, ul. Medyczna 9
Tel. +48 12 620 54 50

Kierownik – prof. dr hab. Marcin Kołaczkowski



RPW/15239/2022
Data: 2022-08-04
JMB

RECENZJA

rozprawy doktorskiej p.t. „Metabolomic approach to understand the mechanism of metformin-induced PRODH/POX-dependent apoptosis in MCF-7 breast cancer cells”, wykonanej przez mgr Thi Yen Ly Huynh, Doktorantkę w Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, pod kierunkiem promotora – prof. dr. hab. Jerzego Pałki.

Recenzja została opracowana na zlecenie Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, w oparciu o art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (z późn. zm.), dotyczący wymagań stawianym rozprawom doktorskim.

Rozprawa doktorska mgr Thi Yen Ly Huynh została przedstawiona w postaci anglojęzycznej pracy pisemnej, stanowiącej zbiór dwóch opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów, opatrzonej opisem scalającym, umieszczającym przedstawiane badania w kontekście awansu doktorskiego. Tym samym można stwierdzić, że niniejsza rozprawa **jest zgodna z wymaganiami ustawowymi dotyczącymi formy rozprawy doktorskiej (art. 187 pkt. 3)**. Co więcej, należy podkreślić, że taka forma rozprawy doktorskiej wychodzi naprzeciw nowoczesnym trendom i stanowi wartość dodaną. Wskazuje bowiem, że badania tam opisane zostały już przyjęte i pozytywnie zrecenzowane, co stanowi potwierdzenie ich istotności dla społeczności naukowej. Jako że przedmiotowe publikacje mają charakter wieloautorski, zgodnie z wymaganiami, do rozprawy dołączone zostały oświadczenia o wkładzie poszczególnych naukowców w powstanie

tych artykułów. Sama Doktorantka określiła swój wkład na 60%, a oświadczenia współautorów są zgodne i nie pozostawiają wątpliwości co do wiodącej roli Doktorantki. Co istotne, polegała ona nie tylko na wykonaniu większości prac, ale także, wspólnie z promotorem, na ich zaplanowaniu, a następnie odpowiedniej interpretacji otrzymanych wyników. Wkład Doktorantki jest więc nie tylko wiodący pod względem ilościowym, ale co najważniejsze, ma charakter typowo naukowy, właściwy poziomowi doktorskiemu. Można więc stwierdzić, że Doktorantka **wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, co stanowi bardzo istotny przyczynek do spełnienia wymogów zawartych w art. 187, pkt. 1.**

Oparcie pracy na załączonych publikacjach wpłynęło na jej objętość, a także sposób przedstawienia treści zawartych w opisie scalającym zbiór publikacji. Całość pracy pisemnej stanowi 116 stron maszynopisu, z czego oryginalny, nie wchodzący w skład opublikowanych artykułów opis scalający, stanowi około 45 stron. Proporcja taka jest jak najbardziej zasadna, zważywszy na zawarcie wielu informacji, szczególnie o charakterze metodycznym, w załączonych publikacjach.

Publikacja nr 1, zatytułowana „Understanding the role of key amino acids in regulation of proline dehydrogenase/proline oxidase (PRODH/POX)-dependent apoptosis/autophagy as an approach to targeted cancer therapy”, opublikowana w czasopiśmie *Molecular and Cellular Biochemistry*, w 2020 roku, jest pracą przeglądową, która stanowi bardzo dobre podsumowanie stanu wiedzy poprzedzającego podjęcie prac eksperymentalnych w ramach rozprawy, osadzając je w odpowiednim kontekście.

Z treścią pierwszej publikacji koresponduje kilkunastostronicowa część wstępna opisu scalającego, w którym poruszone zostały wszystkie zagadnienia istotne do odpowiedniego zrozumienia kolejno przedstawionych badań własnych, m. in.: homeostaza i metabolizm komórek nowotworowych, aktywność przeciwnowotworowa metforminy, autofagia i apoptoza oraz powiązanie z nimi kluczowych dla badań enzymów PRODH/POX, czy też regulacyjne role aminokwasów. Dopełnieniem tych treści jest część wstępna drugiej publikacji z cyklu, a także dane z piśmiennictwa, szeroko przywoływanego w dyskusjach, zarówno w obu publikacjach, jak i opisie scalającym. Zarówno zawartość informacyjna wyżej wskazanych fragmentów, jak przejrzysty sposób wypowiedzi świadczą **o wysokiej ogólnej wiedzy teoretycznej Doktorantki w zgłębianej dyscyplinie naukowej, wskazując tym samym na całkowite wypełnienie wymagań art. 187 pkt.1 Ustawy.**

Publikacja 2, zatytułowana „Metformin Treatment or PRODH/POX-Knock out Similarly Induces Apoptosis by Reprograming of Amino Acid Metabolism, TCA, Urea Cycle and Pentose Phosphate Pathway in MCF-7 Breast Cancer Cells”, opublikowana w czasopiśmie *Biomolecules*, w 2021 roku, jest pracą oryginalną, przedstawiającą najważniejsze badania własne Doktorantki, stanowiące podstawę do ubiegania się o stopień doktora. Zawarte w publikacji badania realizują założenia nakreślone zarówno w samym manuskrypcie, jak i w rozdziale opisu scalającego, dotyczącego celów pracy doktorskiej. Należy podkreślić, że cele badań eksperymentalnych zostały prawidłowo zdefiniowane, biorąc pod uwagę opisany we wcześniej wskazywanych rozdziałach stan techniki. W świetle przytoczonej argumentacji, zaplanowane badania mają zarówno potencjał poznawczy, jak i aplikacyjny. Albowiem, poszerzają one wiedzę na temat metabolizmu komórek nowotworowych, szczególnie w kontekście roli PRODH/POX oraz wpływu metforminy, a także wskazują na możliwe kierunki rozwoju przyszłej farmakoterapii. Ten ostatni kontekst jest szczególnie istotny społecznie, z uwagi na wagę wciąż nierozwiązanego problemu medycznego, jakim są nowotwory piersi.

Rozdział „Materials and Methods” w opisie scalającym jest bardzo skromny (niespełna półstronicowy), co jest jednak całkowicie zrozumiałe, gdyż metody te zostały bardzo szczegółowo opisane w publikacji drugiej. A warsztat metodologiczny jest bardzo szeroki. Obejmuje on zarówno badania proliferacji komórek nowotworowych, analizę cyklu komórkowego z użyciem cytometrii przepływowej, badanie ekspresji białek metodą Western Blot, czy metabolomikę celowaną metodą LC/MS. Ważnym aspektem prowadzonych badań, istotnie podnoszącym ich atrakcyjność i wartość naukową, jest zastosowanie linii komórkowej raka piersi MCF-7, z wyłączonym genem PRODH/POX (PRODH/POX knock-out), otrzymaną z użyciem nowatorskiej techniki CRISPR-Cas9. Wartym podkreślenia, w kontekście awansowych ocenianych badań, jest duże zaangażowanie Doktorantki w zastosowanie tak urozmaiconych technik. W świetle zgodnie przedstawionych przez Doktorantkę i jej współautorów oświadczeń, Doktorantka zaangażowana była bezpośrednio w wykonanie wszystkich wyżej wspomnianych badań, wykazując się przy tym umiejętnością współpracy, także międzynarodowej, co z pewnością wpłynęło na rozwój jej kompetencji.

Wyniki prac eksperymentalnych są bardzo interesujące. Do szczególnych osiągnięć Doktorantki w tym zakresie należy zaliczyć:

- potwierdzenie potencjału przeciwnowotworowego metforminy, wykazując jej aktywność cytotoksyczną względem komórek raka piersi MCF-7,
- stwierdzenie, że efekt ten wiąże się z indukcją apoptozy, poprzez przeprogramowanie metabolizmu aminokwasów, cyklu Krebsa, cyklu mocznikowego oraz szlaku pentozofosforanowego
- potwierdzenie hipotetyzowanego w planach badawczych zaangażowania PRODH/POX w ten efekt,
- ustalenie, że efekty antyproliferacyjne metforminy są obserwowane zarówno dla komórek hodowanych na podłożu z glutaminą, jak i bez glutaminy, przy czym są silniejsze w przypadku braku glutaminy,
- obserwacja, że podobne efekty metaboliczne i proapoptyczne do traktowania metforminą można uzyskać, w przypadku braku glutaminy, także poprzez wyłączenie genu PRODH/POX,

Bardzo interesująca i potencjalnie użyteczna klinicznie jest także konkluzja z powyższych badań, sugerująca, że łączne zastosowanie metforminy i inhibitorów syntezy glutaminy może pozwolić na uzyskanie synergistycznego efektu przeciwnowotworowego i stanowić nowy kierunek w poszukiwaniu skutecznej terapii nowotworów piersi.

Warto dodać, że przedstawione wyniki zaopatrzone są szerokimi materiałami dodatkowymi (supporting information), które podkreślają rzetelność wykonanych badań i zwiększają możliwość ich reprodukcji.

Reasumując, należy stwierdzić, że w ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej **dokonano sformułowania i oryginalnego rozwiązania problemu naukowego, wypełniając tym samym wymagania art. 187 pkt. 2.**

Analiza ciekawych i wartościowych wyników przedstawionych w treści rozprawy skłoniła mnie do sformułowania kilku pytań, które chciałbym aby stały się przyczynkiem do dyskusji w trakcie obrony:

1. Chciałbym prosić o rozwinięcie kwestii molekularnego mechanizmu działania metforminy, skutkującego jej wpływem na metabolizm komórki nowotworowej i wynikające z tego działanie antyproliferacyjne. Sposób działania metforminy przedstawiony na rycinie 9 (str. 39) sugeruje, że jest to inhibicja któregoś z enzymów biorących udział w metabolizmie pirogronianu (PYR KINASE lub PKM2). Tymczasem w literaturze zetknąłem się z konkluzjami, że metformina wpływa na ekspresję tych enzymów. Poznanie szczegółowego mechanizmu działania metforminy na poziomie molekularnym jest istotne, chociażby z punktu widzenia poszukiwania innych obok metforminy nowych leków, wywierających podobny wpływ na komórki nowotworowe. Czy należy szukać inhibitorów PYR KINASE/PKM2? Czy związków hamujących ich ekspresję?
2. Czy zastosowane w badaniach stężenie metforminy 20 mM jest stężeniem, którego osiągnięcia można spodziewać się w warunkach klinicznych? Jak koresponduje ono ze stężeniami wolnej frakcji metforminy, występującymi podczas jej stosowania jako leku przeciwcukrzycowego?
3. Czy zastosowanie inhibitorów syntezy glutaminy, których synergia z metforminą została zasugerowana jako jedna z konkluzji pracy doktorskiej, jest klinicznie bezpieczne? Jakich ewentualnie działań niepożądanych można by się spodziewać? Czy Doktorantka mogłaby zasugerować jakieś konkretne przykłady? Jaki byłby proponowany model badawczy do przetestowania hipotezy łącznego stosowania tych związków?

Warto dodać, że poza wysokim poziomem naukowym, praca jest również bez zarzutu od strony edytorskiej. Napisana jest zwięzłym i klarownym językiem, opatrzona licznymi rycinami, tabelami i schematami, a także wyjaśnieniami skrótów i odpowiednimi podsumowaniami.

Reasumując, oceniana rozprawa doktorska stanowi oryginalny i indywidualny wkład Doktorantki w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych i spełnia wszystkie wymagania zawarte w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (z późn. zm.). Mając powyższe na uwadze, z pełnym przekonaniem składam wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Thi Yen Ly Huynh i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysoką wartość przedłożonej dysertacji, składam także wniosek o jej wyróżnienie.

Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM
Zakład Chemii Leków
prof. dr hab. Marcin Kolačzkowski
kierownik