



UNIwersytet Medyczny w Lublinie

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką

ul. Chodźki 4A (Collegium Pharmaceuticum), 20-093 Lublin

tel. (081) 448 7250



### **Recenzja pracy doktorskiej**

**p.t. „Ocena aktywności przeciwnowotworowej terapii skojarzonej z użyciem pochodnej 1,2,4-triazyny (MM-129) oraz inhibitora 2,3-dioksygenazy indolowej-1 (indoximodu)” wykonanej przez**

**mgr farm. Iwonę Kwiatkowską**

**na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej**

**Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku**

**pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Dariusza Pawłaka, Kierownika Zakładu**

**Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku;**

**Promotor pomocniczy: dr hab. n. farm. Justyna Hermanowicz z Zakładu**

**Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku**

Jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny jest poszukiwanie nowych, skutecznych i bezpiecznych leków przeciwnowotworowych w tym takich, które modulować mogą szlaki immunosupresyjne, zważywszy na to, iż układ immunologiczny może zarówno hamować jak i nasilać rozwój komórek nowotworowych. Oba typy komórek mogą tym samym wchodzić ze sobą w reakcje wzajemnie się zwalczające (wg teorii immunoedycji). Wydaje się, że zakłócenie mechanizmów immunosupresji może skutecznie odblokować układ odpornościowy i w rezultacie skierować pełen potencjał odporności przeciwko guzowi. Poszukiwanie „sieci immunosupresyjnych” wytwarzanych przez nowotwór wydaje się mieć ogromne znaczenie, ponieważ może przyczynić się do odkrycia całkiem nowych miejsc dla terapeutycznej interwencji, tym razem przy użyciu małych

związków molekularnych zamiast stosowanych dotychczas (w immunoterapiach) czynników biologicznych. Już w 1863 roku Rudolf Virchow zauważył, że guzy nowotworowe są zawsze nacieczone leukocytami, i zasugerował związek pomiędzy „przeziękami” zapalnymi a złośliwieniem komórek. Na tej podstawie sformułowano w/w teorię opisującą różne, plastyczne, kilkietapowe relacje pomiędzy nowotworem a układem immunologicznym. W ostatnim dziesięcioleciu dokonał się znaczący postęp w wyjaśnieniu mechanizmów nabywania zdolności do ucieczki immunologicznej przez guzy nowotworowe. Jeden z ważnych kierunków poszukiwań nowych strategii terapii nowotworów i wytłumaczenia ich patogenezy uwzględnia rolę 2,3-dioksygenazy indoloaminy 1 (IDO-1), która jest pierwszym enzymem w szlaku przemian metabolicznych od tryptofanu do kinureniny. Przyjmuje się, iż ten szlak metaboliczny przemian stanowi główny regulator odporności wrodzonej i nabytej. Aktywacja IDO jest więc przykładem mechanizmu, w którym komórki guza mogą opuścić układ immunologiczny. Dodatkowo obserwuje się wyższą aktywność IDO-1, której aktywność może być indukowana czynnikami prozapalnymi, w większości zmienionych nowotworowo tkanek (np. w raku okrężnicy czy płuc) i wskazuje na znaczącą rolę w oporności nowotworów wobec układu immunologicznego. Wysoka aktywność IDO kojarzona jest ze słabymi rokowaniami podczas terapii antynowotworowej, stanowić więc może ona nowy cel farmakoterapii. Trwają więc testy w fazie badań przedklinicznych i klinicznych nad lekami z grupy inhibitorów IDO, jak np. indoximod (IND) i ich skuteczności u

pacjentów z zaawansowanymi nowotworami, przede wszystkim w terapiach skojarzonych, przykładowo z inhibitorami szlaku PD-1/PD-L1.

Rozprawa doktorska opracowana przez panią mgr farm. Iwonę Kwiatkowską poświęcona jest właśnie tym zagadnieniom. Stanowi ją monotematyczny cykl 2 prac opublikowanych w specjalistycznym czasopiśmie Cancers (2021 praca przeglądowa oraz 2023 praca doświadczalna). Łączna wartości współczynnika wpływu tych prac wynosi 11.775 (280 pkt. MNiSW). Po przeanalizowaniu ich treści potwierdzam niezwykle wysoka ich wartość merytoryczną i naukową. Analizując dołączone kopie publikacji stwierdzam ponadto, iż są to prace wieloautorskie (z Promotorami jako jednymi ze współautorów), w obu Doktorantka jest pierwszą autorką.

Należy podkreślić, iż dodatkowo do dokumentacji dołączono podpisane oświadczenia współautorów i samej Doktorantki, wskazujące na ich wkład w powstawanie poszczególnych publikacji, z opisem realizowanych zadań (w przypadku Doktorantki podała ona także udział procentowy udziału w ich powstawaniu, szacowany na odpowiedni 80% i 60%). Uważam więc dokumentację przedstawioną do wglądu recenzentom za kompletną.

Układ dysertacji doktorskiej jest typowy dla tego typu prac. Autorka obok kopii wspomnianych publikacji zamieściła wprowadzenie z właściwie i precyzyjnie określonym celem podjętej tematyki, opis materiałów i metod, podsumowanie wyników i dyskusję, właściwie wyszczególnione wnioski oraz piśmiennictwo. Dołączono także streszczenia w języku polskim i angielskim, zgodę Komisji Bioetycznej oraz informacje o dorobku naukowym Doktorantki.

Cel pracy opiera się na zbadaniu: i) aktywności przeciwnowotworowej łącznego podania związku MM-129, pochodnej 1,2,4-triazyny posiadającego potencjalne właściwości przeciwnowotworowe (po wcześniejszym zbadaniu jej profilu bezpieczeństwa) z IND wobec komórek raka jelita grubego w modelu Danio rerio; ii) żywotności komórek raka jelita grubego (linie komórkowe gruczolakoraka jelita grubego DLD-1 i HT-29) po podaniu MM-129 i IND; iii) wpływu łącznego podania MM-129 i IND na procesy apoptozy; iv) wpływu łącznego podania MM-129 i IND na ekspresję białek zaangażowanych w sygnalizację wewnątrzkomórkową oraz 2,3-dioksygenazy indolowej-1.

Zastosowano nowatorskie metody badawcze w tym badania procesu nowotworzenia w modelu zebrafish, indukcji apoptozy dokonując porównania wobec trzech grup odpowiedniej kontroli pozytywnej oraz zmian w potencjale transbłonowym mitochondriów pod wpływem MM-129 i IND oraz ich kombinacji, oba testy z zastosowaniem metody cytometrii przepływowej, a także badanie aktywacji kaspaz i ekspresji białek kinazy białkowej B (AKT) i 2,3-dioksygenazy indolowej-1 (IDO1) metodą elektroforezy kapilarnej i immunodetekcji.

Za najważniejsze osiągnięcia naukowe opublikowane w drugiej, eksperymentalnej pracy z cyklu uznać można m.in. wykazanie iż: i) jednoczesne podanie MM-129 i IND, związków o różnych punktach uchwytu i aktywności przeciwnowotworowej, hamowało proliferację komórek i rozwój nowotworu jelita grubego w ksenograftach Danio rerio; ii) połączenie tych związków nasiliło procesy apoptozy zależne od kaspaz, obniżyło potencjał mitochondrialny komórek

nowotworowych oraz zaburzyło ekspresję białek AKT i IDO1, tym samym zmniejszyła się żywotność komórek raka jelita grubego obu użytych linii komórkowych.

Badania te mogą przyczynić się do podjęcia dalszych badań nad efektywnym leczeniem nowotworów i opracowaniem optymalnych strategii terapeutycznych, w tym zakładających, iż w znaczącym stopniu aktywność przeciwnowotworowa cytostatyków może ulec zwiększeniu przy jednoczesnym osłabieniu ścieżki przemian kinurenyiny.

Jeśli chodzi o stronę techniczną, graficzną, edytorską i językową, to rozprawa jest starannie zredagowana, jej język i terminologia naukowa poprawne. Piśmiennictwo, odpowiednio dobrane i aktualne, zostało zacytowane właściwie. Dowodzi to właściwego warsztatu naukowego Doktorantki i jej przygotowania do redagowania prac naukowych.

W podsumowaniu chcę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa będąca spójnym tematycznie cyklem dwóch opublikowanych prac łącznie z ich omówieniem, dotyczy bardzo ważnego, nowatorskiego nie do końca poznanego, ale i trudnego tematu badawczego. Eksperymenty będące podstawą publikacji doświadczalnej zaplanowano, wykonano i opisano starannie, a prace dołączone do monotematycznego cyklu posiadają dużą wartość naukową. Dojrzałe merytorycznie omówienie wyników stanowiących podstawę poszczególnych publikacji ma charakter ogólny i dobrze odnosi otrzymane wyniki do współczesnej wiedzy. Praca niesie istotne i nowe treści, a oryginalne wyniki, dotyczące potencjalnie korzystnych

powiązań, także z klinicznego punktu widzenia, będą bardzo przydatne dla farmakologów (i onkologów-klinicystów) poruszających się w obrębie analizowanej tematyki badań związanej z jeszcze bardziej skuteczną i bezpieczniejszą polichemioterapią chorób nowotworowych, w tym raka jelit grubego. Mogą się także przyczynić do zaprojektowania nowych, skutecznych strategii terapeutycznych w oparciu o opisane punkty wychwyty nowych i już stosowanych leków. Podjęte przez Panią **mgr farm. Iwonę Kwiatkowską** badania, precyzyjne sformułowanie ich celu, zakresu i sposobu przeprowadzenia doświadczeń wraz z dokonaniem przeglądu literaturowego w pierwszej pracy uważam za przemyślane. W świetle przytoczonych przez Doktorantkę danych podjęty temat dysertacji jest wysoce uzasadniony i wnosi wiele nowych elementów o charakterze poznawczym i wdrożeniowym.

Podsumowując, rozprawę doktorską pani mgr farm. Iwony Kwiatkowskiej p.t. „Ocena aktywności przeciwnowotworowej terapii skojarzonej z użyciem pochodnej 1,2,4-triazyny (MM-129) oraz inhibitora 2,3-dioksygenazy indolowej-1 (indoximodu)”, wykonaną pod kierunkiem pana Promotora, prof. dr hab. n. med. Dariusza Pawlaka, Kierownika Zakładu Farmakodynamiki i dr hab. n. farm. Justyny Hermanowicz, Promotora pomocniczego, z w/w Zakładu Farmakodynamiki, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, oceniam bardzo wysoko.

Rozprawa spełnia ustawowe warunki o stopniach naukowych i tytule naukowym zawarte w Prawie o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.).

Wnioskuje do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie pani **mgr farm. Iwony Kwiatkowskiej** do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę istotność podjętej tematyki, nowatorstwo i znaczenie naukowe oraz kliniczne wyników oraz samej metodyki badań wnioskuje o wyróżnienie rozprawy.



Lublin, 5.07.2024