



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej

ul. Grunwaldzka 6
60-780 Poznań

tel.: 61 8546651
fax: 61 8546652
e-mail: ajelinsk@ump.edu.pl

Poznań, dnia 26 lipca 2022 r.

Recenzja pracy doktorskiej Pani Thi Yen Ly Huynh

pt. *Metabolomic approach to understand the mechanism of metformin-induced PRODH/POX-dependent apoptosis in MCF-7 breast cancer cells,*

wykonanej pod kierunkiem Pana Prof. dra hab. Jerzego Pałki

w Katedrze Chemii Leków Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Przedstawiona do recenzji praca porusza bardzo ciekawe i istotne zagadnienie, jakim jest poszukiwanie nowych celów molekularnych w leczeniu nowotworów. Uwzględniając coraz większą zachorowalność na nowotwory, brak skutecznych metod leczenia niektórych z nich, podjęcie badań zmierzających do wyjaśnienia mechanizmu działania przeciwnowotworowego metforminy w komórkach raka piersi MCF-7 uważam za bardzo uzasadnione. Jako narzędzie badawcze wykorzystano analizę metabolomiczną, na podstawie której określono profil metabolomiczny komórek nowotworowych MCF-7 typu dzikiego oraz MCF-7 ze znokautowanym PRODH/POX, wytworzonego przy użyciu technologii CRISPR-Cas9, poddanych działaniu metforminy (MET). Punktem wyjścia do tego typu badań jest zmienność procesów biochemicznych w komórkach nowotworowych w stosunku do komórek zdrowych. Temat ten częściowo analizowany w piśmiennictwie, także w Jednostce, w której realizowana była praca doktorska, nie został dogłębnie wyjaśniony, zwłaszcza w odniesieniu do komórek raka piersi, stąd wyniki analizy Autorki mogą pozwolić na znaczące poszerzenie wiedzy w tym zakresie. W badaniach Doktorantka wykorzystwała następujące techniki: (i) CyQUANT®Cell Proliferation Assay do badania proliferacji komórek; (ii) cytometrię przepływową Nucleo-Counter NC-3000 do badania cyklu komórkowego; (iii) Western blot do badania ekspresji białek proapoptotycznych; (iv) wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas z potrójnym kwadrupolem do analizy metabolomicznej. Założenia przyjęte w niniejszej rozprawie doktorskiej oparte były na hipotezie zakładającej, że metformina aktywuje kinazę AMP(AMPK), która indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych, a dzieje się to poprzez szereg następujących po

5

wpt. 29.08.2022 JP

sobie procesów, które obejmują generowanie przez dehydrogenazę prolinową/oksydazę prolinową reaktywnych form tlenu w warunkach dostępności proliny, substratu PRODH/POX. W przedstawionym opracowaniu opisano szczegółowo zmiany zachodzące w komórkach w warunkach niedoboru węglowodanowych i lipidowych substratów energetycznych oraz rolę w tych procesach proliny.

Układ pracy jest typowy dla publikacji będącej zbiorem prac własnych Autorki. Praca składa się z pięciu podstawowych rozdziałów, w tym wprowadzenia, celu pracy, materiałów i metod, wyników, dyskusji, wniosków, publikacji 1-2 oraz dodatkowo zawiera informacje na temat źródeł finansowania, wykazu zastosowanych w pracy skrótów, wykazu osiągnięć naukowych Doktorantki, piśmiennictwa i załączników. Praca liczy 116 stron, z czego 40 stron zajmują publikacje wraz z dodatkowymi załącznikami.

W rozdziale *Wstęp* Autorka opisała działanie i zastosowanie metforminy, homeostazę i przemiany prowadzące do nowotworów oraz szlaki sygnalizacyjne uczestniczące w tych procesach, proces autofagii, apoptozy oraz metaboliczną rolę dehydrogenazy i oksydazy proliny, a także ich udział w procesie apoptozy i autofagii, proces glikolizy oraz znaczenie cyklu TCA, kończąc swoje rozważania podrozdziałem aminokwasy jako regulatory metabolizmu.

W kolejnym rozdziale – *Cel pracy* Autorka doprecyzowała cel swoich badań oraz przedstawiła jakie badania eksperymentalne zostaną przeprowadzone. Rozdział ten kończy stwierdzeniem, że końcowym rezultatem Jej badań powinno być ustalenie roli PRODH/POX w mechanizmie MET-zależnej apoptozy oraz określenie nowego celu molekularnego w eksperymentalnej terapii raka piersi.

W krótkim rozdziale *Materiały i metody*, Autorka opisała sposób prowadzenia badań, podkreślając, że są one szczegółowo przedstawione w załączonych publikacjach.

Kolejny rozdział, najistotniejszy dla oceniającego to *Wyniki i dyskusja*.

Po tych rozdziałach Autorka zamieszcza dwie publikacje, w których opisano wszystkie przeprowadzone badania. Wymienione prace to:

1. *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.* Molecular and Cellular Biochemistry 2020; <https://doi.org/10.1007/s1010-020-03685-y>.
2. *Metformin treatment or PRODH/POX-knock out similarly induces apoptosis by reprogramming of amino acid metabolism, TCA, urea cycle and pentose phosphate*

pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Biomolecules* 2021; 11, 1888.
<https://doi.org/10.3390/biom11121888>.

W obu pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, co jest warunkiem koniecznym przy procedowaniu prac doktorskich. Łączna wartość wskaźnika Impact Factor (IF) dla prezentowanego cyklu prac wynosi 8,275, co odpowiada 170 punktom Ministerstwa Edukacji i Nauki. Załączone oświadczenia współautorów o udziale Doktorantki w powstawaniu publikacji potwierdzają Jej znaczący wkład w zaplanowanie, wykonanie badań, opis i analizę uzyskanych wyników oraz przygotowanie manuskryptu publikacji.

Założenia pracy zostały przygotowane prawidłowo, a odpowiedzi na pytania, przedstawione jako cele pracy, zostały określone w postaci 6 wniosków, spośród których wniosek 6 jest najbardziej obiecujący, jeżeli chodzi o nowe perspektywy terapii raka piersi. Wniosek ten kończy się stwierdzeniem, że skojarzone leczenie MET z inhibitorami syntezy glutaminy może być nowym podejściem do dalszych badań nad eksperymentalną terapią raka piersi.

Wnioski sformułowane są poprawnie i wynikają z przeprowadzonej w pracy analizy i dyskusji. Analiza wyników własnych Doktorantki została przeprowadzona z wykorzystaniem prawidłowo dobranych testów statystycznych.

Przedstawiona dyskusja potwierdza znajomość i zrozumienie poruszanych zagadnień z zakresu nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Wykonane przez Doktorantkę badania, ich omówienie i wnioski potwierdzają umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych oraz dobrej współpracy z innymi zespołami badawczymi, wnoszą także znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauki farmaceutyczne, są cenne dla farmaceutów, lekarzy oraz naukowców z dziedzin pokrewnych.

W podsumowaniu pragnę zwrócić uwagę na kilka aspektów. To co jest godne podkreślenia, to nowatorski przedmiot pracy. Także jakość przeprowadzonych badań jest wysoka i zasługuje na uznanie. Doktorantka miała wprawdzie możliwość realizacji badań w bardzo dobrym zespole badawczym, pod kierunkiem Pana Prof. Jerzego Pałki, uznanego autorytetu w tym zakresie, jednakże bez Jej zaangażowania, realizacja tak zaplanowanego zakresu badań byłaby niemożliwa.

Dobór literatury w liczbie 168 pozycji, uwzględnia najnowsze piśmiennictwo i spełnia wymagania w tym zakresie. Przedstawiona dyskusja potwierdza znajomość i zrozumienie poruszanych zagadnień.

Podczas obrony pracy chciałabym poruszyć następujące zagadnienie – czy na podstawie przeprowadzonych badań widzi Pani nowe możliwości leczenia nowotworów. Jakie grupy leków wydają się Pani najbardziej odpowiednie do tego celu, czy można także rozważyć

repozycjonowanie leków stosowanych w innych schorzeniach. Moje kolejne pytanie dotyczy metforminy, czy na podstawie przeprowadzonych w Jednostce badań, może być ona lekiem wykorzystanym w leczeniu nowotworów innych narządów oraz jaka jest dawka, która jest niezbędna do osiągnięcia efektu terapeutycznego w przypadku chorób nowotworowych, a także jakich potencjalnych działań niepożądanych można w tym przypadku oczekiwać.

Inne osiągnięcia Doktorantki

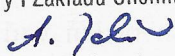
Doktorantka przedstawiła listę publikacji, których jest współautorem, poza cyklem dwóch prac uwzględnionych w rozprawie doktorskiej. Jest to 7 prac eksperymentalnych o sumarycznym IF = 32,719, co odpowiada 760 punktom MEiN oraz 8 prac poglądowych (145 pkt MEiN). Autorka prezentowała wyniki swoich badań na 10 konferencjach krajowych i zagranicznych. Zamieściła również listę grantów i projektów naukowych, których była beneficjentem/wykonawcą oraz kursów, dzięki którym mogła podnieść swoje kwalifikacje naukowe. Dane te potwierdzają bardzo duże zaangażowanie Doktorantki oraz są bardzo dobrym prognostykiem Jej dalszego rozwoju naukowego.

Wnioski i końcowa konkluzja

Zaproponowane i przeprowadzone przez Doktorantkę badania posiadają duże znaczenie w sensie naukowym, ale i praktycznym. Uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej wyniki badań mogą się przyczynić do opracowania nowych, bardziej skutecznych i bezpiecznych metod leczenia nowotworów piersi. Oczywiście, pierwszym etapem w tych rozważaniach są procesy biochemiczne zachodzące w komórkach nowotworowych, które zostały przez Autorkę szczegółowo zbadane i opisane.

Oceniając pozytywnie, zarówno pod względem formalnym, jak i merytorycznym pracę doktorską Pani Thi Yen Ly Huynh pod tytułem *Metabolomic approach to understand the mechanism of metformin-induced PRODH/POX-dependent apoptosis in MCF-7 breast cancer cells*, potwierdzam, że stanowi ona oryginalne i wartościowe opracowanie naukowe i dlatego mam zaszczyt zwrócić się do Pana Dziekana i Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o przyjęcie pracy, i dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej


Prof. zw. dr hab. n. farm. Anna Jelińska