



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII
DOŚWIADCZALNEJ PAN
im. Ludwika Hirsfelda we Wrocławiu

Dr. hab. Wojciech Kałas

Dr. hab. Wojciech Kałas
Laboratorium Immunobiologii
Molekularnej Nowotworów
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław
Email: wojciech.kalas@hirsfeld.pl

Wysoka Rada
Dyscypliny Nauk Medycznych
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
ul. Mikulicza-Radeckiego 5
50-345 Wrocław

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Marii Błaszczyk p.t.:

"Związki hamujące biosyntezę cholesterolu jako modulatory aktywności przeciwnowotworowej leków przeciwpsychotycznych i przeciwdepresyjnych w komórkach raka jelita grubego - badania *in vitro*"

Tematyka pracy

Rak jelita grubego jest poważną i jedną z częściej występujących chorób nowotworowych. Jedną z mniej znanych jego cech jest zwiększona produkcja kwasów tłuszczowych. Uważa się, że interwencja w metabolizm lipidowy komórek raka jelita grubego może stanowić dogodny cel terapii przeciwnowotworowej. Przedstawiona do recenzji praca jest próbą określenia racjonalności zastosowania leków przeciwdepresyjnych, których jednym z działań niepożądanych jest ogólnoustrojowy wpływ na gospodarkę lipidową, w onkologii. Ich działanie mogłoby być wzmocnione przez zastosowanie inhibitorów syntezy cholesterolu simwastatyny i betuliny. Doktorantka testowała dużą grupę leków, by znaleźć takie, które wykazywałyby synergiczne działanie z inhibitorami syntezy cholesterolu, a następnie podjęła próbę określenia mechanizmu ich współdziałania. Praca ta jest elementem ważnego i aktualnego nurtu badań naukowych dotyczącym repozycjonowania leków.

Uwagi ogólne i opis pracy

W *Części teoretycznej* Autorka omawia informacje dotyczące epidemiologii raka jelita grubego, z uwzględnieniem stosowanych terapii przeciwnowotworowych i prezentuje przesłanki do zastosowania swojego modelu i konkretnych linii komórkowych. Nakreślono zarys metabolizmu cholesterolu i opisano mechanizm działania statyn jako związków hamujących jego syntezę. Doktorantka dodatkowo zwięźle przedstawia związki przeciwpsychotyczne, a następnie prezentuje przegląd literatury dotyczącej ich wpływu na rozwój nowotworów, terapię przeciwnowotworową i metabolizm cholesterolu, gdzie upatruje potencjału do synergicznego działania statyn i leków antypsychotycznych. Na przywołaną w pracy bibliografię składa się 274 pozycji literatury, z których większość pochodzi z ostatnich 10 lat. Aby uwypuklić racjonalność badań podjętych w swojej pracy, Autorka objaśnia zagadnienia związane z repozycjonowaniem farmaceutyków oraz terapią kombinowaną ze środkami obniżającymi stężenie cholesterolu w osoczu. Wstęp teoretyczny nader dobrze uzasadnia tematykę podjętych w rozprawie badań i umożliwia umieszczenie uzyskanych wyników w szerszym kontekście. Dotyczy to szczególnie doświadczeń i wyników przedstawionych w pierwszej części pracy. Moim zdaniem brakuje przedstawienia wiedzy i rozumowania, które uzasadnia pomiary lub szacowanie parametrów bioinformatycznych i biofizycznych z drugiej części rozprawy. Jak interpretować przytoczone wartości deskryptorów molekularnych, takich jak moment dipolowy czy też twardość

chemiczna w kontekście przytoczonych wyników badań? Pomimo tych mankamentów treść wstępu pozwala wysoko ocenić znajomość podejmowanej tematyki oraz dobór literatury i umiejętność wykorzystania źródeł.

W *Celu pracy* Autorka jasno i zwięźle przedstawia przesłanki do podjęcia badań oraz uściśla obszary podejmowanych badań. Mają one na celu określenie perspektyw wykorzystania leków antypsychotycznych do leczenia chorób nowotworowych. Powodem do przeprowadzenia takiego studium są dane na temat mniejszej zapadalności na niektóre typy nowotworów u pacjentów leczonych lekami antypsychotycznymi. Natomiast postulowany mechanizm działania przeciwnowotworowego miałby polegać na interwencji w zaburzony metabolizm cholesterolu występujący w komórkach raka jelita grubego. Dodanie simwastatyny, szerokostosowanego leku hamującego syntezę cholesterolu, lub betuliny miałyby wzmacniać wpływ przeciwpysychotyków na metabolizm cholesterolu i tym samym zwiększać ich cytotoksyczność wobec komórek raka jelita grubego. W świetle przytoczonych badań podjętą tematykę należy uznać za wyjątkowo trafną. Propozycja, by terapię przeciwnowotworową oprzeć na interwencji z zaburzony metabolizm cholesterolu w komórkach raków jelita grubego stanowi ciekawy i oryginalny wkład Doktorantki. Natomiast pewną niezręcznością jest użycie w tekście tego rozdziału czasu przeszłego, np.: "zbadano", "sprawdzono".

W kolejnych częściach *Materiały i Metodologia badań* Autorka skrupulatnie opisuje użyte materiały i zastosowane metody badawcze. Jestem pod dużym wrażeniem staranności Autorki przy opisie metod, w którym zostały uwzględnione nawet drobne, ale istotne, detale np. parametry filtrów optycznych z cytometrii przepływowej. W zasadzie przy lekturze tej części rozprawy pracy zabrakło mi jedynie zakresów stężeń leków użytych w przypadku konkretnych linii komórkowych.

Rezultaty przeprowadzonych doświadczeń zostały przystępnie opisane w rozdziale *Wyniki*. Przedstawiając otrzymane dane Autorka często objaśnia zasady interpretacji wykonanych testów. Wszystko to zostało zilustrowane na czytelnych i estetycznych rysunkach oraz w przejrzystych tabelach. Lektura tego rozdziału dowodzi, że Pani Maria Błaszczyk może się poszczycić znajomością wielu narzędzi bio-informatycznych, metod biofizycznych, a przede wszystkim pokaźnej liczby metod, jakie towarzyszą żmudnej pracy na modelach komórkowych. Tymi środkami Doktorantka godnie zmierzyła się z postawionymi sobie celami. Mimo że duża część pracy poświęcona jest opisowi własności fizykochemicznych badanych leków, nie przytoczono wyników analizy korelacji tych współczynników z danymi eksperymentalnymi np. cytotoksycznością. Tego typu analiza byłaby doskonałą klamrą pomiędzy badaniami *in vitro* a analizą parametrów fizykochemicznych. Próba znalezienia korelacji stanowi niewykorzystany potencjał i niezależnie od wyników znacząco podniosłaby wartość merytoryczną przedstawionej monografii.

Całość pracy doktorskiej wieńczy 18-stronicowa *Dyskusja, Podsumowanie* i 6 krótkich i jasnych *Wniosków*. Te ostatnie rozdziały, w których Autorka może dokonać spójnej i klarownej syntezy swoich obszernych badań, zdecydowanie świadczą o umiejętności formułowania właściwych problemów i hipotez badawczych, a także o poprawności doboru metod i narzędzi badawczych oraz do umiejętności ich zastosowania do weryfikacji postawionych hipotez badawczych. Potencjalne zastosowanie leków przeciwpysychotycznych w terapii przeciwnowotworowej jest mocno dyskutowaną możliwością. Przeprowadzone przez Doktorantkę szeroko zakrojone badania *in vitro* wnoszą do tej dyskusji wiele wartościowych wyników, wobec których nie można przejść obojętnie. Wysoko zatem oceniam wartość uzyskanych wyników, ich potencjał publikacyjny i znaczenie dla nauki.

Ocena struktury pracy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została przygotowana w formie monografii i składa się ze wstępu teoretycznego, celu pracy, części metodycznej, wyników, dyskusji, podsumowania i wniosków. Te zasadnicze rozdziały zostały uzupełnione streszczeniami w języku polskim i angielskim, wykazem skrótów, spisami rysunków i tabel oraz bibliografią. Struktura pracy odzwierciedla utarte zwyczaje i nie mam do niej najmniejszych zastrzeżeń. Praca została również dobrze przygotowana pod względem typograficznym. Tekst jest schludny, tabele i rysunki bardzo przejrzyste. Drobną moją jedynie estetyczną uwagą jest małe wyeksponowanie podstawowych rozdziałów np. *Dyskusji* większym tytułem i rozpoczęciem od nowej strony. Jest to drobna uwaga typograficzna, niewpływająca na zasadniczo bardzo dobrą ocenę struktury pracy i podziału treści. Rozprawa jest napisana poprawną polszczyzną, do której wkradły się jedynie nieliczne literówki. Zatem bardzo dobrze oceniam pracę od strony językowej, stylistycznej i interpunkcyjnej.

Pytania i uwagi krytyczne

Wszystkie wymienione powyżej uwagi mają bardziej charakter komentarzy niż zarzutów i nie wpływają na całościowo dobrą ocenę, przedstawionej mi do recenzji rozprawy. Nie uważam za konieczne odniesienie się do nich. Natomiast obowiązkiem recenzenta jest jednak próba odsłonięcia słabszych punktów i niedociągnięć recenzowanej pracy. W związku z tym chciałbym poruszyć następujące kwestie:

1. Zastosowane w rozprawie testy mierzące cytotoksyczność opierają się na pomiarach absorbancji światła o długości fal 491 nm lub 570 nm . Przedstawione na **Rysunku 3** wzory strukturalne badanych związków pokazują, że wszystkie badane związki zawierają układy cykliczne i aromatyczne. Czy zbadano absorbancję badanych związków w tych długościach fali? Czy którykolwiek z zastosowanych związków absorbuje światło o długości fali 491 nm lub 570 nm ?
2. Opisując wyniki dotyczące testu, w którym za pomocą jodku propidyny, określa się zawartość DNA w komórkach, służącego do wykrywania apoptozy lub badania cyklu komórkowego Autorka na **stronie 108** pisze o komórkach będących "w fazie sub-G1 cyklu komórkowego". Czym charakteryzuje się ta "faza cyklu komórkowego"? Czy można mówić o analizie cyklu komórkowego, gdy 80% "eventów" reprezentuje komórki ulegające apoptozie?
3. Problematiczna jest interpretacja wyników różnych testów opisujących kondycję komórek po traktowaniu lekami. Zgodnie z opisem imipramina i trifluoperazyna w testach cyklu komórkowego zostały użyte w stężeniach odpowiadającym IC_{50} (zahamowanie wzrostu o połowę). Jednak na **Rysunku 19** przedstawiającym wyniki tych doświadczeń aż 80% "eventów" reprezentowało komórki o sub-diloidalnej zawartości DNA, czyli *komórki apoptotyczne*. Co więcej, wykresy przedstawione na **Rysunku 21**, pokazują, że w tych samych warunkach w badanych hodowlach dominowały komórki barwiące się Aneksyną V, ale z których niemalże wszystkie zachowywały integralność błony komórkowej. Proszę przedyskutować te wyniki.
4. Analiza cytotoksyczności farmaceutyków zastosowanych w pracy była, w dużej mierze, przeprowadzona przy użyciu *wyliczonych parametrów IC_{50}* . W **Tabeli 9** na stronie 68 Autorka przedstawia wartości IC_{50} obliczone na podstawie wyników testów SRB, które mają opisywać cytotoksyczność 6 związków względem komórek NDHF i FHC. Przytoczone i obliczone wartości parametru IC_{50} dla komórek NHDF w przypadku prawie wszystkich zbadanych związków (z wyjątkiem flufenazyny) bardzo *daleko wykraczają poza zakres użytych doświadczalnie stężeń (Rysunek 5 i strona 63)*. Na jakiej podstawie mogła Pani pozwolić sobie na tak daleką interpolację wyników? Jakie są przesłanki wiarygodności uzyskanych wartości? Jak interpretować wartości, które znacząco przekraczają rozpuszczalność testowanych związków np. $585\text{ }\mu\text{M}$

klozapiny¹ lub ponad 10 000 μM rysperydonu²?

5. W tej samej **Tabeli 9** przytoczono wartości IC_{50} wybranych leków wobec komórek FHC w tym dla flufenazyny, które wyniosło 35 μM . Jak należy interpretować tę wartość w świetle danych z **Rysunku 6**, gdzie w stężeniu 40 μM przeżywalność komórek spadała jedynie o około 30%, a co więcej w stężeniu 150 μM nadal utrzymywała się powyżej 50%? Podobną sprzeczność można zaobserwować w przypadku danych dotyczących komórek HT29 i imipraminy w **Tabeli 7**, gdzie wartość IC_{50} została określona na poziomie powyżej 100 μM , natomiast na **Rysunkach 8 i 14** pokazano, że już pięciokrotnie niższe stężenie 20 μM było wystarczające, by obniżyć żywotność komórek do ok. 50%. Co więcej, traktowanie 100 μM tego leku, przeżyło jedynie 30% komórek. Jakie były powody, aby w analizie cytotoksyczności dać pierwszeństwo wyliczonym wartościom IC_{50} nad wartościami obserwowanymi doświadczalnie?
6. Istotną część pracy stanowi próba określenia natury współdziałania leków przeciwpsychotycznych i simwastatyny lub betuliny. Analiza **Tabeli 11** pokazuje, że w przypadku komórek HT29 simwastatyna *zmniejszała* cytotoksyczność aż dwunastu leków a zwiększała jedynie trzech. Natomiast w komórkach HT29/Dx dane sugerują, antagonizm w ośmiu przypadkach a synergii tylko w pięciu przypadkach. Pozwala to na wysunięcie tezy, że dominującym lub najczęstszym sposobem interakcji simwastatyny z lekami przeciwpsychotycznymi, jeśli badamy ich cytotoksyczność, jest antagonizm. Niestety w opisie wyników, dyskusji i wnioskach brak jest odniesienia do tych danych. Dlaczego? Jaki mógłby być mechanizm tego typu interakcji simwastatyny z innymi lekami?
7. Moim zdaniem mało wiarygodna jest numeryczna analiza synergii przeprowadzona przez Doktorantkę w rozdziałach 3.4 i 3.5. Jaskrawym przypadkiem jest tu rzekoma synergia pomiędzy betuliną a rysperydonem. Z przedstawionych na **Rysunku 18** danych wynika, że betulina albo nie wpływała, albo zwiększała przeżywalność komórek HT29/Dx traktowanych rysperydonem. Przykładowo, betulina wyraźnie osłabiała działanie rysperydonu zastosowanego w stężeniach 300 μM lub 400 μM . Wskazywałoby to na antagonistyczne działanie tych leków, natomiast wyliczony parametr CI dla stężeń 300 μM i 400 μM przyjmuje wartości 0,70 i 0,77 charakterystyczne dla synergii. Co może być źródłem tej sprzeczności.
8. Zgodnie z informacjami podanymi w części metodycznej analiza synergii wykonana została metodą Thou-Talalaya za pomocą dedykowanego oprogramowania ComboSyn. Autor metody zaleca jednak, aby w testach synergii używać kombinacji badanych substancji w stałym stosunku³. Np. 1 μM substancji A i 2 μM substancji B, 2 μM substancji A i 4 μM substancji B, itd. Podobnie model HSA (highest single agent) wydaje się mieć zastosowanie do matrycy stężeń, a nie jedynie kombinacji, gdy jeden z leków użyty jest w jednym arbitralnie wybranym stężeniem⁴. Pozwala to na bardziej wnikliwy wgląd w interakcję pomiędzy badanymi związkami. Jakie były przesłanki, by odejść od proponowanego przez autora metody sposobu wykonania testu? Jakie warunki muszą być spełnione, aby testy przeprowadzone w uproszczony sposób zachowały wiarygodność?
9. Zalecam krytyczne podejście do interpretacji danych epidemiologicznych. W literaturze przedmiotu wielokrotnie przywoływany jest fakt mniejszej zapadalności na choroby nowotworowe u osób ze schizofrenią, jako pośredni dowód na przeciwnowotworowe właściwości leków antypsychotycznych⁵. Nawet przy pobieżnej analizie sprawa

¹Clozapine PubChem CID 135398737, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135398737section=Solubility>

²Risperidone PubChem CID5073 ,<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5073section=Solubility>

³Ting-Chao Chou; Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. Cancer Res 15 January 2010; 70 (2): 440–446

⁴Foucquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. Pharmacol Res Perspect. 2015 Jun;3(3):e00149

⁵Huang J et al. Repurposing psychiatric drugs as anti-cancer agents. Cancer Lett. 2018 Apr 10;419:257-265

jest jednak dużo bardziej złożona. Najwyższą zapadalność na nowotwory obserwuje się u osób powyżej 69 roku życia⁶ natomiast czas życia chorych na schizofrenię jest o 9-25 lat krótszy⁷. Co Pani zdaniem jest jeszcze źródłem niepewności analiz porównujących zapadalność na choroby nowotworowe u osób przyjmujących badane przez Panią leki antypsychotyczne a pozostałą częścią populacji?

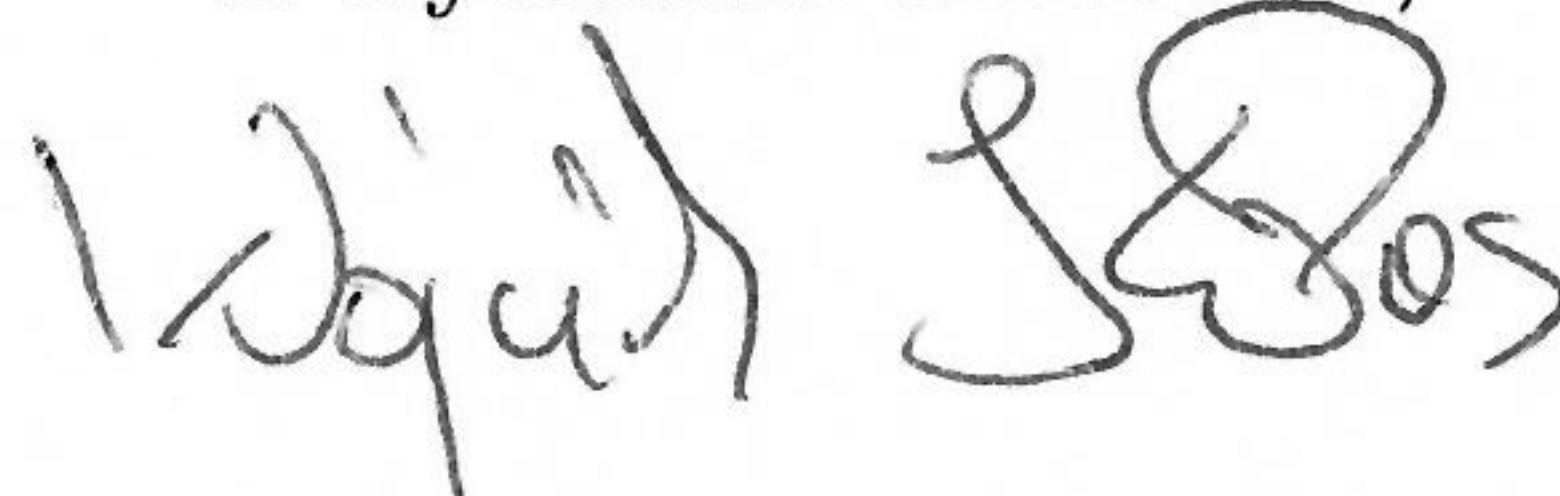
10. Wśród ciekawych odkryć zaprezentowanych w Pani pracy, oprócz tych słusznie wymienionych we wnioskach, nieco przekornie, dodałbym ponad 30 000 razy większe IC₅₀ SN-38 w komórkach HT29 w obecności simwastatyny. Ta, przytoczona w Tabeli 11, obserwacja jest zupełnie przemilczana przez Autorkę. Podobno Winston Churchill miał powiedzieć, że *"ludziom zdarza potknąć się o prawdę, jednak większość zbiera się i spieszy gdzieś dalej, jakby nigdy nic"*. Nawet z zastrzeżeniem, że stężenia simwastatyny w surowicy pacjentów przyjmujących ten lek są ponad 3000 razy niższe, wynik ten z pewnością zasługuje na większą uwagę.

Wniosek końcowy

Podsumowując, przedstawiona rozprawa autorstwa Pani mgr inż. Marii Błaszczyk p.t.: *"Związki hamujące biosyntezę cholesterolu jako modulatory aktywności przeciwnowotworowej leków przeciwpsychotycznych i przeciwdepresyjnych w komórkach raka jelita grubego - badania in vitro"* jest dowodem na umiejętność samodzielnego planowania i prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę. Zawiera ona interesujące i unikalne wyniki badań otrzymane wieloma trudnymi metodami, łączące zagadnienia dziedziny biologii i farmacji z elementami bioinformatyki. Pracę oceniam pozytywnie i stwierdzam, że **recenzowana rozprawa doktorska w pełni spełnia warunki określone w art. 187. ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku, "Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce"** (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.). Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 7 sierpnia 2023

Z wyrazami szacunku,



Dr. hab. Wojciech Kałas

⁶Hodgson R et al. Cancer and schizophrenia: is there a paradox? J Psychopharmacol. 2010 Nov;24(4 Suppl):51-60

⁷Wildgust HJ et al. The paradox of premature mortality in schizophrenia: new research questions. J Psychopharmacol. 2010 Nov;24(4 Suppl):9-15

