

Dr hab. inż. Anna Wojakowska  
Zakład Proteomiki Biomedycznej  
Pracownia Spektrometrii Mas  
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN  
e-mail: astasz@ibch.poznan.pl

  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE  
zastępca przewodniczącego  
m. Podhorska-Okołów  
prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okołów

Uniwersytet Medyczny  
we Wrocławiu



RPW/14016/2023 P  
Data:2023-08-10

Poznań, 07.08.2023

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
BIURO RADY DYSCYPLINY  
NAUKI MEDYCZNE

wpl.  
dnia

11-08-2023

L. dz. RN-BM/

1428

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marii Błaszczyk zatytułowanej

„Związki hamujące biosyntezę cholesterolu jako modulatory aktywności przeciwnowotworowej leków przeciwpysychotycznych i przeciwdepresyjnych w komórkach raka jelita grubego – badania *in vitro*”

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Biofizyki i Neurobiologii,

Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,

pod kierunkiem dr hab. Olgi Wesołowskiej w roli promotora oraz dr inż. Anny Palko-Łabuz w roli promotora pomocniczego

### Podstawa wykonania recenzji

Recenzję wykonano na zlecenie Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z dnia 26.06.2023 r.

### Uzasadnienie podjęcia tematu rozprawy doktorskiej

Podstawową metodą leczenia raka jelita grubego (RJG) jest resekcja chirurgiczna połączona z radio- lub/i chemioterapią. Niestety, pomimo właściwej interwencji chirurgicznej i zastosowania leczenia uzupełniającego, często dochodzi do wznowy miejscowej i przerzutów do innych tkanek i narządów. Istotnym problemem w terapii onkologicznej jest kwestia oporności komórek nowotworowych na stosowaną terapię, co znacząco zwiększa ryzyko progresji nowotworu. Zasadnym jest zatem poszukiwanie nowych podejść terapeutycznych, będących odpowiedzią na problem lekooporności, a także toksyczności zastosowanego leczenia, w szczególności u pacjentów źle odpowiadających na terapię. W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie użyciem znanych leków antydepresyjnych oraz przeciwpysychotycznych w terapiach onkologicznych, ze względu na ich właściwości cytotoksyczne związane ze zdolnością do zaburzenia metabolizmu kwasów tłuszczowych i cholesterolu w komórkach nowotworowych. Zmiany w lipidomie komórek nowotworowych związane są z zaburzonymi funkcjami przekazywania sygnału w komórce i zmienną przepuszczalnością błon komórkowych, co istotnie wpływa na procesy adhezji, migracji, metastazy i lekooporności. Istnieje zatem konieczność poszerzenia wiedzy w kontekście mechanizmów działania leków przeciwpysychotycznych na komórki nowotworowe, co stanowić powinno podstawę do ich potencjalnego wprowadzenia do terapii onkologicznych. Z tego względu podjęta przez mgr inż. Marię Błaszczyk tematyka pracy doktorskiej, dotycząca określenia potencjału grupy wybranych leków przeciwpysychotycznych i przeciwdepresyjnych

do hamowania proliferacji komórek linii raka jelita grubego oraz określenia wpływu badanych leków na zaburzenie homeostazy cholesterolu, stanowi ważny i uzasadniony problem badawczy.

### **Ocena merytoryczna pracy i jej struktury**

Przedłożona do recenzji praca doktorska ma postać manuskryptu obejmującego łącznie 186 stron i składającego się z następujących części: wprowadzenie literaturowe, uzasadniające słuszność podjętego tematu badawczego, zastosowane metody badawcze, obszerna część wynikowa, dyskusja, podsumowanie i wnioski. Zasadniczą część pracy poprzedza wykaz użytych skrótów oraz tożsame streszczenia w języku polskim i angielskim, natomiast na końcu pracy znajduje się spis zamieszczonych rysunków (34) i tabel (30), a także spis literaturowy liczący 274 pozycje. Praca napisana jest poprawnie, zarówno pod względem stylistycznym jak i gramatycznym. Sporadycznie pojawiają się drobne błędy interpunkcyjne i literówki.

We wstępie Doktorantka przybliżyła kwestie istotne z punktu widzenia podjętego problemu badawczego, w tym m.in. przedstawia molekularną charakterystykę komórek raka jelita grubego, uzasadnia istotną rolę biosyntezy cholesterolu oraz udział tratw lipidowych w progresji chorób nowotworowych oraz opisuje przeciwnowotworowe i modulujące homeostazę cholesterolu właściwości leków przeciwpowotworowych, przeciwdepresyjnych oraz innych (statyny i betulina). Ta część pracy została omówiona przez Doktorantkę bardzo szczegółowo, odwołano się do znaczącej liczby doniesień literaturowych. Odbiór wstępu ułatwiłoby zamieszczenie większej ilości rycin, w szczególności w kontekście opisu tratw lipidowych i innych struktur błonowych, w których istotną rolę pełni cholesterol. W tym miejscu nasuwa się pytanie czy skład molekularny tratw lipidowych jest charakterystyczny dla danego nowotworu oraz czy istnieją doniesienia o jego korelacji z progresją, przerzutowaniem i odpowiedzią na terapię w jaku jelita grubego? Czy wykorzystane w badaniach prowadzonych przez Doktorantkę błonowe struktury modelowe nawiązują składem lipidowym do tych występujących w komórkach nowotworowych, w szczególności w RJG? Ponadto, Doktorantka opisuje podtypy molekularne raka jelita grubego, jednak na tym etapie nie wspomina jakimi podtypami są wykorzystane w badaniach linie komórkowe HT29 oraz COLO205. Taką informację znajdujemy na etapie dyskusji wyników, a warto byłoby ją umieścić już na początku pracy przy omawianiu charakterystyki użytych linii komórkowych. Proszę również Doktorantkę o wyjaśnienie jakimi kryteriami kierowano się przy doborze linii wykorzystanych do badań. W podrozdziale dotyczącym właściwości przeciwnowotworowych leków przeciwpowotworowych Doktorantka cytuje badania, które donoszą, że stężenie tych leków niezbędne do wywołania cytotoksyczności komórek nowotworowych jest znacznie większe niż dawka terapeutyczna stosowana w leczeniu zaburzeń psychicznych. Czy w związku z tym wykorzystanie tego typu leków może być potencjalnie bezpiecznie stosowane w terapii onkologicznej?

Za nadrzędny cel pracy Doktorantka wyznaczyła sobie ocenę cytotoksyczności szeregu substancji z grupy leków antydepresyjnych i przeciwpowotworowych, wraz z uwzględnieniem ich zdolności do selektywnego hamowania wzrostu komórek RJG. Badania prowadzono na liniach komórkowych gruczolakoraka jelita grubego COLO205 i HT29 oraz sublinii odpornej na deoksyrybicynę HT29/Dx. W celu określenia selektywności badanych związków do badań włączono linię prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego FHC oraz prawidłową linię fibroblastów skóry ludzkiej NHDF. Dla wybranych związków zbadano również wpływ na ekspresję genów



zaangażowanych w biosyntezę cholesterolu: HMGCR oraz LDLR. Ponadto, zbadano antyproliferacyjne właściwości wybranych leków stosowanych samodzielnie oraz w kombinacjach z substancjami o znanym wpływie na metabolizm cholesterolu, w poszukiwaniu synergii pomiędzy simwastatyną lub betulina a badanymi związkami. Godnym podkreślenia jest fakt, iż badania te wpisują się w nowe podejście repozycjonowania (ang. drug *repurposing*), zakładające możliwość zmiany przeznaczenia leków stosowanych w psychiatrii i potencjalnego wykorzystania ich w terapii nowotworów. Za dodatkowy cel pracy Doktorantka wyznaczyła sobie określenie wpływu wybranych leków przeciwpsychotycznych na mikrodomeny błonowe wzbogacone w cholesterol i sfingomielinę (tzw. tratwy lipidowe), przy zastosowaniu ogromnych jednowarstwowych liposomów (GUV). Wykorzystanie tego typu układów modelowych do badania oddziaływania leków przeciwpsychotycznych z błonami biologicznymi stanowi nowatorski element przedstawionej pracy doktorskiej. Końcowym etapem badań było wykorzystanie narzędzi bioinformatycznych i modelowania molekularnego w celu przewidzenia oddziaływania wybranych badanych związków z dwuwarstwami lipidowymi oraz ich zachowania w błonie komórkowej, a także określenia fizykochemicznych właściwości związków istotnych dla ich działania przeciwnowotworowego. Przedstawione przez Doktorantkę cele uważam za niezwykle ambitne, wymagające szerokiej wiedzy bio- i fizykochemicznej oraz znajomości różnorodnych technik badawczych i obliczeniowych. Ponadto, Doktorantka podeszła kompleksowo do badania związków mogących potencjalnie znaleźć nowe zastosowanie w terapii onkologicznej, określając ich cytotoksyczność, selektywność, synergię, właściwości fizykochemiczne oraz charakter oddziaływania z błonami w systemach modelowych.

W części doświadczałnej Doktorantka w sposób wyczerpujący i szczegółowy przedstawia wykorzystywane w pracy materiały i metody badawcze. Na uwagę zasługuje mnogość technik stosowanych w pracy (hodowle komórkowe, analiza cytotoksyczności, analiza oddziaływania między związkami, cytometria przepływowa, analiza ekspresji genów, mikroskopia fluorescencyjna, elektroformacja GUV, mikrokalorymetria, spektrofluorymetria przy użyciu sond fluorescencyjnych, analizy fizykochemiczne i modelowanie molekularne), dzięki którym możliwe było kompleksowe scharakteryzowanie właściwości cytotoksycznych oraz fizykochemicznych badanej grupy leków. Z uwagi na znaczącą liczbę testowanych związków, których właściwości były badane na kilku liniach i poddawane wielu testom w różnych kombinacjach, korzystne byłoby zamieszczenie ogólnego schematu prowadzonych badań. Proszę również o uzasadnienie przez Doktorantkę, dlaczego część testów, takich jak badanie cyklu komórkowego, apoptozy, ROS, ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę cholesterolu oraz barwienie wolnego cholesterolu było wykonane tylko dla linii HT29.

Część wynikowa jest bardzo obszerna, obejmuje 77 stron i opatrzona jest 30 rycinami i 23 tabelami. Większość rycin i tabel uwzględnia istotność statystyczną badanych związków. Proszę o wyjaśnienie przez Doktorantkę, dlaczego w tabelach 7-10, przedstawiających wartości parametru IC dla określenia aktywności cytotoksycznej badanych związków względem linii HT29, HT29/Dx, COLO205 i linii komórek prawidłowych, nie uwzględniono wartości istotności statystycznej. Doktorantka podczas opisu aktywności cytotoksycznej badanych związków posługuje się określeniami średnia/wysoka/niska toksyczność. Proszę o doprecyzowanie zakresów wartości  $IC_{50}$  dla tych określeń. Doktorantka w pracy badała cytotoksyczność łącznie 19 związków, przy czym 17 dla linii HT29 oraz HT29/Dx, 10 dla linii COLO205 oraz 6 dla linii komórek prawidłowych. Aktywność



cytotoksyczną w kombinacji z simwastatyną (SIM) w liniach HT29 i HT/Dx badano dla 16 związków, natomiast w linii COLO205 dla 6 związków. Aktywność cytotoksyczną w kombinacji z betuliną (BET) w liniach HT29 i HT/Dx badano dla 7 związków, natomiast w linii COLO205 dla 6 związków. Określono również typ wzajemnego oddziaływania kombinacji związków (synergizm lub antagonizm) na podstawie indeksu kombinacji oraz przedstawiono graficzną wizualizację efektu kombinacji badanych związków (klozapina, imiprymina, flufenazyna, trifluoperazyna, flupentyksol, rysperydon). Doktorantka zbadała również wpływ wybranych leków antypsychotycznych (IMP, TFP i FLP) oraz ich kombinacji z SIM i BET na cykl komórkowy, proces apoptozy i poziom reaktywnych form tlenu. Dalej badano poziom ekspresji genów lipogennych w komórkach linii HT29 i HT29/Dx po 24 i 48 godzinach inkubacji z wybranymi związkami (KLZ, IMP, FLU, TFP, FLP, RIS) oraz analizowano ilość wolnego cholesterolu w komórkach HT29 inkubowanych przez 48 godzin z wybranymi związkami (jak wyżej oraz dodatkowo SIM, BET, B1 i B2). Na jakiej podstawie dokonano wyboru czasu inkubacji dla tych oznaczeń? Następnie doktorantka przechodzi do badań wpływu wybranych związków na mikrodomeny błonowe w układach modelowych w postaci ogromnych jednowarstwowych liposomów (GUV). Badano rozkład liczby domen oraz ich powierzchni i kształtu w obecności badanych związków. Określono również właściwości fizykochemiczne i farmakologiczne badanych związków w badaniach *in silico*. Zbadano również wpływ oddziaływania betuliny i jej nowo zsyntetyzowanych pochodnych B1 i B2 na termotropowe właściwości błony lipidowej oraz uporządkowanie błony liposomów. Szereg przeprowadzonych przez Doktorantkę badań w sposób kompleksowy i szczegółowy stał się podstawą do próby wyjaśnienia mechanizmu działania testowanych związków na komórki raka jelita grubego oraz dostarczył istotnych informacji dla ewentualnych prób ich wprowadzenia do terapii onkologicznej.

Na 17 stronach dyskusji Doktorantka bardzo wnikliwie i wyczerpująco analizuje uzyskane i opisane w części eksperymentalnej wyniki. Z uwagi na obszerność zebranych danych, część dyskusji mogłaby być z powodzeniem podzielona na podrozdziały ułatwiające czytelnikowi podążanie za poszczególnymi jej częściami. Doktorantka ponownie przywołuje cel pracy, jako konieczność sprawdzenia czy leki z grupy związków przeciwpsychotycznych i przeciwdepresyjnych mają zdolność do hamowania proliferacji komórek linii RJG oraz czy działanie to jest skorelowane z ich zdolnością do zaburzenia homeostazy cholesterolu. Przedłożony cel został zrealizowany przy wykorzystaniu wielu technik badawczych. Wykazano, że leki przeciwpsychotyczne wykazują się różną aktywnością cytotoksyczną wobec różnych linii RJG, a różnice te mogą wynikać z ich morfologii i podtypu molekularnego. Ponadto, wszystkie spośród 6 badanych leków (KLZ, IMP, FLU, TFP, FLP, RIS) wykazują się selektywną cytotoksycznością wobec badanych linii komórek nowotworowych oraz indukują ekspresję genów lipogennych (za wyjątkiem RIS). Działanie cytotoksyczne 3 z nich (TFP, FLP i IMP) było potęgowane przez dodatek SIM. Badania wykazały, że efekt ten w dużym stopniu zależał od użytej linii komórkowej i stężenia dostarczonego leku. Wykazano również, że badane leki przeciwpsychotyczne mogą pobudzać procesy uszkodzające DNA komórek linii HT29 oraz prowadzić do ich programowanej śmierci. Doktorantka ponadto wykazała, że simwastatyna oraz większość leków wykazujących synergizm działania z SIM, powodowały obniżenie poziomu wolnego cholesterolu w komórkach, co jest podstawą cytotoksycznego działania badanych leków. Zaobserwowano również, że leki przeciwpsychotyczne silnie wpływają na pole powierzchni, kształt i liczbę mikrodomen lipidowych w układach modelowych GUV. Należy podkreślić, że Doktorantka prowadzi pionierskie badania wykorzystujące GUVy do badania oddziaływania

związków przeciwpsychotycznych z błonami. Czy Doktorantka planuje kontynuację zapoczątkowanych badań nad oddziaływaniem leków z trawami lipidowymi izolowanymi z komórek? Ważnym aspektem badań przeprowadzonych przez Doktorantkę była również analiza interakcji nowych pochodnych BET (B1 i B2) z dwuwarstwami lipidowymi, które mogą wpływać na ich zróżnicowaną aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych RJG.

### **Podsumowanie**

Przeprowadzone przez Doktorantkę kompleksowe badania nad wpływem leków przeciwpsychotycznych i przeciwdepresyjnych na zdolność do hamowania proliferacji komórek linii RJG oraz zaburzenia w nich homeostazy cholesterolu stanowią istotny wkład dla prób wprowadzania tych leków do terapii przeciwnowotworowej. Ponadto pionierskie badania nad wykorzystaniem układów modelowych zawierających cholesterol i sfingomielinę do badania wpływu tych leków na mikrodomeny lipidowe zasługuje na duże uznanie. Należy również podkreślić, że część wyników przedstawionych w niniejszej pracy zostało niedawno opublikowanych w pracy pt.: „Modulators of cellular cholesterol homeostasis as antiproliferative and model membranes perturbing agents” w czasopiśmie *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* (IF:3,4), której Doktorantka jest pierwszym autorem. Pomimo przedstawionych powyżej drobnych uwag krytycznych, które nie umniejszają wagi zrealizowanego celu naukowego, przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską oceniam pozytywnie i doceniam naukową dojrzałość, dociekliwość i ogrom pracy włożonej przez Doktorantkę na każdym etapie jej realizacji. Pani mgr inż. Maria Błaszczuk wykazała się szeroką wiedzą i właściwym warsztatem badawczym, które pozwoliły na sprostanie przedłożonym celom zrealizowanej pracy doktorskiej.

### **Wnioski**

W mojej opinii przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (tj. Dz. U. 2018 poz. 1668). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Marię Błaszczuk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Dr hab. inż. Anna Wojakowska

