UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką
ul. Chodźki 4A (Collegium Pharmaceuticum), 20-093 Lublin
tel. (081) 448 7250,

Lublin, dnia 15 października 2018 roku

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Matalińskiej
pt. „ Naturalne peptydy oraz ich analogi modulujące aktywność komórek nowotworowych czerniaka"

wykonanej w Zakładzie Neuropeptydów
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie
pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandry Misickiej-Kęsik
oraz prof. dr hab. Andrzeja W. Lipkowskiego (2009-12)

Praca była współfinansowana z środków statutowych Zakładu Neuropeptydów oraz z środków Unii Europejskiej uzyskanych w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki (2013). Część badań została opublikowana w czasopiśmie Folia Neuropathologica (2013).

Zasady farmakoterapii bólów nowotworowych zostały opracowane po raz pierwszy przed 32 laty (1986 r.) przez zespół ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), i od tego czasu obowiązują w niemal niezmienionej postaci. Dopełnieniem tych zasad są zalecenia ekspertów Europejskiego Towarzystwa Opieki Paliatywnej (EAPC) dotyczące leczenia morfiną i alternatywnymi opioidami, opublikowane w 2001 r. Według wytycznych WHO w terminalnej chorobie nowotworowej, kiedy ból odczuwa prawie 70-80% pacjentów, podstawowymi lekami przeciwbólowymi są opioidy, a wśród nich fentanyl, buprenorfina, metadon czy morfina. Jednakże przewlekłe stosowanie opioidów, szczególnie agonistów MOR, wiąże się z możliwością wystąpienia objawów niepożądanych, takich jak np. tolerancja na działanie przeciwbólowe, depresja oddychania, zaparcia czy nawet progresja komórek nowotworowych, chociaż w tym przypadku wyniki są sprzeczne (Lennon i wsp. 2012; Kim et al., 2016).

Z drugiej strony, rośnie zachorowalność na nowotwory. Dane statystyczne mówią, że są one główną przyczyną zgonów na całym świecie. W 2013 roku na raka zachorowało 13 mln ludzi a zmarło 8,2 mln. WHO szacuje, że w 2030 roku liczna zachorowań wzrośnie o 75%. W większości przypadków rak rozpoznawany jest w późnym stadium choroby, co ogranicza możliwości terapeutyczne. Dla tych pacjentów jedyną opcją leczenia jest opieka paliatywna, zwłaszcza zwalczanie bólu. Dlatego wprowadzenie nowych leków do kontroli bólu nowotworowego, bez uciążliwych skutków niepożądanych, pozostaje ogromnym wyzwaniem dla naukowców.

Obecnie prowadzone badania koncentrują się na: 1) stosowaniu znanych leków w nowej formulacji (preparaty o przedłużonym działaniu, systemy transdermalne, dopoliczkowe postacie analgetyków, i inne), 2) tworzeniu nowych schematów dawkowania, 3) wprowadzenie do terapii nowych struktur chemicznych, posiadających znany mechanizm działania, 4) tworzenie nowych kombinacji znanych leków przeciwbólowych w celu zwiększenia bezpieczeństwa i skuteczności terapii, 5) stosowanie w terapii bólu leków pierwotnie stosowanych w innych schorzeniach oraz 6) wprowadzenie leków o nowym mechanizmie działania.

Praca doktorska mgr inż. Joanny Matalińskiej bardzo dobrze wpisuje się w nurt badań naukowych dotyczących poszukiwania nowych leków przeciwbólowych. W pracy, kontynuując nurt badawczy Pana prof. A. Lipkowskiego, opisano właściwości biologiczne nowych związków o budowie hybrydowej, zaprojektowanych i zsyntetyzowanych w Zakładzie Neuropeptydów IMDiK PAN, ligandów zarówno receptorów opioidowych (MOR i DOR) jak i tachykininowych NK1. Związki użyte do badań to: agonista opioidowy/antagonista receptorów tachykininowych NK1 (związki o symbolach: 3020, 3266, 3052), agonista opioidowy/agonista receptorów tachykininowych NK1 (3051), antagonista receptorów tachykininowych NK1 (2080) oraz wzorcowy agonista (naturalny peptyd substancja P) i wzorcowy antagonista (aprepitant) receptorów tachykininowych NK1. Jako hipotezę rozprawy Doktorantka przyjęła założenie, że związki hybrydowe mogą mieć działanie wielofunkcyjne: cytostatyczne na komórki nowotworowe czerniaka jak również działanie przeciwbólowe. W celu weryfikacji tej hipotezy przebadała w/w związki a) pod kątem ich powinowactwa do MOR i DOR oraz receptorów tachykininowych NK1, b) obecności MOR i DOR na powierzchni badanych komórek nowotworowych (czerniaka)/prawidłowych oraz c) pod kątem cytotoksyczności (żywotność, zmiana liczy komórek - test wielodniowy, proliferacja komórek poprzez oznaczenie ekspresji białka Ki67, zdolność komórek do tworzenia kolonii) *in vitro* i d) pod kątem aktywności przeciwbólowej badanych związków (szczurzy model ostrego bólu) *in vivo*.

Rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Matalińskiej liczy 158 ponumerowanych stron. Składa się na nią część teoretyczna i doświadczalna. Obydwie części poprzedza streszczenie w języku polskim i angielskim, spis treści oraz wykaz skrótów, rycin (62) i tabel (9). W części teoretycznej umieszczono wstęp oraz założenia i cel pracy. Część doświadczalna obejmuje materiały i metody, wyniki, omówienie wyników oraz wnioski i piśmiennictwo (176 pozycji).

We wstępie rozprawy (str. 10-32) Doktorantka wprowadziła czytelnika w tematykę pracy. Przedstawiła wiadomości na temat czerniaka, jego epidemiologii, klasyfikacji, patogenezy i metod leczenia. Następnie przedstawiła informacje na temat drogi przewodzenia bólu i jej funkcjonowania, dane o układzie opioidowym, receptorach i ich ligandach oraz wpływie opioidów na wzrost i proliferacje komórek nowotworowych. W końcowej części wstępu Doktorantka zebrała wiadomości na temat tachykinin i ich receptorów, roli substancji P i receptora tachykininowego NK1 w procesach nowotworowych oraz scharakteryzowała związki hybrydowe.

Podsumowując tą cześć rozprawy należy stwierdzić, że materiał zaprezentowany w tej części pracy przedstawiony został w sposób czytelny, interesujący i oparty na starannie dobranych pracach źródłowych i monograficznych, zwłaszcza tych opublikowanych w ostatnich latach. Uważam, że Doktorantka wykazała się bardzo dobrym przygotowaniem teoretycznym do prowadzonych badań. W sposób rzeczowy przedyskutowała zagadnienia, które stały się podstawą jej rozprawy doktorskiej.

Następna część rozprawy to rozdział - Założenia i cel pracy, w której Doktorantka sformułowała i przedstawiła główne cele pracy i hipotezy badawcze. Dokonując ich oceny uważam, że zostały przestawione w sposób jasny i precyzyjny. Cele szczegółowe są spójne z celem głównym rozprawy i wszystkie korespondują z podstawionym problemem badawczym.

Część doświadczalną rozpoczyna rozdział - Materiały i metody (str. 33-40), który przedstawia warunki przeprowadzonych doświadczeń oraz stosowane metody badawcze. Rozdział ten został podzielony na 5 podrozdziałów. W pierwszych dwóch podrozdziałach Autorka przedstawiła użyte substancje oraz linie komórkowe (czerniaka: MeW151, MeW155 i MeW164 oraz prawidłowe komórki dojrzałych fibroblastów: F1W180 i Fib9 i komórki płodowe: F1Wp95) wykorzystane do badań cytotoksyczności substancji. Następnie scharakteryzowała użyte testy, które posłużyły do oceny cytotoksyczności substancji (test MTT, test określający zmianę liczby komórek, ich zdolność do tworzenia kolonii, ocenę ekspresji białka Ki-67), metody oceny receptorów opioidowych MOR i DOR na powierzchni komórek nowotworowych/prawidłowych oraz badania powinowactwa związków do receptorów opioidowych (MOR i DOR) i tachykininowych NK1. Opisała test „usuwania ogona", który posłużył do oceny przeciwbólowe działanie wybranych związków u szczurów po ich jednorazowym podaniu. Rozdział kończy opis metod statystycznych użytych do analizy wybranego materiału.

Wykorzystując w/w procedury badawcze Doktorantka uzyskała dużą pulę wyników, które opisała (str. 41-82) i przedstawiła na 57 rycinach oraz w 2 tabelach. Dowodzi to dużej pracy, jaką włożyła w realizację zamierzonych badań i staranność w przedstawieniu wyników, a liczba wykonanych eksperymentów jest wręcz imponująca. Analiza statystyczna oraz interpretacja danych nie budzą wątpliwości. Doktorantka wykazała się znajomością metod statystycznych oraz krytycyzmem przy wnioskowaniu. Badania zostały przeprowadzone i zaplanowane rzetelnie, z wykorzystaniem klasycznych oraz nowoczesnych technik i metod badawczych. Tak więc część doświadczalna rozprawy zasługuje na wysoką ocenę, a uzyskane wyniki stanowią spójną całość.

Następnie przeprowadzono dyskusję otrzymanych wyników (str. 83-95). Ta część pracy doktorskiej została dobrze opracowana od strony merytorycznej. Świadczy ona o umiejętności interpretacji uzyskanych wyników przez Doktorantkę. Praca zakończona jest 7 wnioskami.

Do najważniejszych walorów recenzowanej pracy doktorskiej zaliczam:

a) Ważność i aktualność badanego tematu. Właśnie kilka dni temu ukazała się publikacja Davida Brinkman'a i wsp. (Naunym Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 391(11), 1169-1178, 2018) kwestionująca użycie morfiny, agonisty MOR, w bólu nowotworowym. W artykule podkreślono wpływ morfiny na progresję nowotworu, proliferację komórek, inwazje guza, angiogenezę, funkcje immunologiczne i potencjał przerzutowy. W świetle tych danych praca doktorska mgr inż. Joanny Matalińskiej jeszcze bardziej zyskuje na aktualności.
b) Wykazanie, że związki hybrydowe o budowie agonista receptorów opioidowych/antagonista receptorów tachykininowych NK1 (3020, 3266) mogą być rozważane jako substancje wyjściowe do syntezy nowych leków przeciwbólowych
c) Wykazanie, że związek hybrydowy (3052) o budowie agonista opioidowy/antagonista receptorów tachykininowych NK1, ale nie wzorcowy ,antagonista receptorów tachykininowych NK1 (aprepitant), może być prototypem leków przeciwnowotworowych, chociaż mechanizm jego działania wymaga wyjaśnienia.

Podsumowując, uważam, że praca doktorska mgr inż. Joanny Matalińskiej zawiera interesujący materiał doświadczalny. Wprowadzone elementy innowacyjności, jak zbadanie cytotoksyczności związków hybrydowych, aprepitantu czy porównanie cytotoksyczności związków w stosunku do komórek czerniaka i komórek zdrowych/prawidłowych podnoszą niewątpliwie walory poznawcze tej pracy. Doktorantka w pełni wywiązała się z postawionych zadań. Pracę oceniam wysoko, pomimo drobnych błędów edytorskich czy niedociągnięć, które nie umniejszają wartości pracy jak np.:

a) brak konsekwencji w używaniu wprowadzonych skrótów (MOR, DOR i pełne nazwy),
b) brak informacji w jakiej objętości podawano wybrane związki podpajęczynówkowo szczurom,
c) na jakiej podstawie wybrano dawki/stężenia użytych substancji do badań *in vitro* i czy takie stężenia są możliwe do osiągniecia *in vivo*,
d) moim zdaniem dobrze by było, gdyby Doktorantka przebadała również wpływ związków hybrydowych na rozwój uzależnienia i tolerancji (podania wielokrotne) na przeciwbólowe działanie tych związków.

Stwierdzam, że przedstawiona rozprawa mgr inż. Joanny Matalińskiej spełnia bez zastrzeżeń wymagania ustawy „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki" (Dz. U. Nr 65 poz. 595) i wnioskuję do Wysokiej Komisji ds. Studiów Doktoranckich i Doktoratów Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława J. Mossakowskiego PAN w Warszawie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. farm.
Jolanta H. Kotlińska