Politechnika Łódzka
Instytut Inżynierii Materiałowej

OCENA

pracy doktorskiej Pani mgr Doroty Pomorskiej, zatytułowanej: *„Badanie nowych syntetycznych heterocykli jako potencjalnych związków o działaniu przeciwnowotworowym"*

Przedstawiona mi do recenzji praca wykonana została w Zakładzie Chemii Biomolekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Anny Janeckiej i przy pomocniczym promotorstwie Pani dr Katarzyny Gach-Janczak. Praca finansowana była z granów:
- Opus NCN nr 2012/07/B/ST5/0-2006, kierowany przez Prof. dr hab. inż. Tomasza Janeckiego;
- Sonata NCN nr 2005/17/D/NZ3/02226, kierowany przez dr Katarzynę Gach-Janczak;
z projektów własnych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi:
- nr 502-03/1-156-02/502-14-191, kierowany przez dr Katarzynę Gach-Janczak;
- nr 502-03/1-156-02/502-14-241, kierowany przez Doktorantkę;
oraz w ramach badań statutowych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 502-03/1-156-02/503-11-02.

Praca obejmuje 147 stron, włączając w to 12 tabel, 31 rysunków, 30 wykresów, 153 pozycji literatury oraz zestawienie dorobku naukowego Doktorantki.

Choroby nowotworowe uznawane są za jedną z głównych przyczyn zgonów w krajach rozwiniętych. Jest to wystarczający powód, aby chorobom tym poświęcić duże nakłady finansowe oraz uwagę pracowników nauki. Pomimo osiągnięcia znaczących postępów w walce z tą chorobą, bo niektóre rodzaje nowotworów poddają się skutecznej terapii, w dalszym ciągu rokowania w przebiegu tej choroby są bardzo poważne. Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy jest to, że pod wspólnym pojęciem chorób nowotworowych mieszczą się bardzo różne nowotwory. Ich cechą wspólną jest niekontrolowany rozrost tkanki nowotworu ale znacząco różnią się przyczyną powstania, mechanizmami funkcjonowania i unikania zniszczenia przez układ odpornościowy a także inwazyjnością. Właściwie należałoby mówić o różnych jednostkach chorobowych, które wymagają zróżnicowanej strategii terapeutycznej dla osiągnięcia sukcesu w ich zwalczaniu. Z tego też powodu bardzo potrzebne są nowe związki chemiczne wykazujące selektywnie efekty toksyczne w stosunku do komórek różnych rodzajów nowotworów, przy akceptowalnym ryzyku ich wpływu na

Instytut Inżynierii Materiałowej
90-924 Łódź, ul. Stefanowskiego 1/15, budynek A18
tel. 42 631 30 30, Sekretariat IV piętro, pok.440
e-mail: inzynieria.materialowa@info.p.lodz.pl, www.mechaniczny.p.lodz.pl

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

prawidłowe komórki organizmu. W tym znaczeniu zainteresowanie Doktorantki nowymi syntetycznymi analogami naturalnie występujących substancji o toksycznym działaniu na komórki ulegające intensywnemu namnażaniu należy uznać za dobrze wpisujące się w aktualny trend badawczy walki z chorobami nowotworowymi.

Manuskrypt rozpoczyna się informacją o źródłach finansowania badań, streszczeniem oraz spisem stosowanych skrótów i symboli, po których następuje wprowadzenie w problematykę dotyczącą rozprawy, oparte na aktualnej literaturze. W pierwszej kolejności omówione są związki chemiczne będące w obszarze zainteresowań badawczych Doktorantki oraz potencjalne mechanizmy ich wpływu na biochemię komórki, w tym głównie na procesy, które mogą być zahamowane w komórce nowotworowej prowadząc do jej śmierci. W następnej kolejności Doktorantka przedstawiła linie komórkowe użyte w trakcie prac badawczych, w tym linie komórkowe wyprowadzone z komórek nowotworowych (komórki raka sutka MCF-7 i komórki białaczki promielocytowej HL-60) oraz komórki pierwszorzędowe śródbłonka naczyniowego HUVEC i prawidłowe komórki epitelialne sutka MCF-10A. Wszystkie rodzaje komórek są pochodzenia ludzkiego. Po tym wprowadzeniu przedstawiony jest cel pracy w formie czterech punktów zarysowujących zamierzenia Doktorantki, to jest:

1. Zbadanie właściwości cytotoksycznych nowych analogów w stosunku do komórek nowotworowych i prawidłowych
2. Wyselekcjonowanie związków o największej aktywności
3. Zbadanie wpływu wybranych analogów na różne procesy komórkowe
4. Ocena synergistycznego działania wybranych związków w połączeniu ze znanymi lekami przeciwnowotworowymi o różnych mechanizmach działania.

W rozdziale Materiał i Metody Doktorantka kolejno przedstawiła:

1. Linie komórkowe użyte w badaniach z podaniem źródła ich pochodzenia i warunków hodowli.
2. Użyte odczynniki i zestawy gotowych odczynników w formie komercyjnie dostępnych testów.
3. Wykaz stosowanej aparatury
4. Metody badawcze, w tym:
   - hodowlę komórkową oraz przygotowanie badanych substancji do użycia
   - badanie cytotoksyczności testem MTT
   - badanie potencjału proliferacyjnego, uszkodzeń DNA oraz indukcji apoptozy z wykorzystaniem testu „Apoptosis, DNA Damage, and Cell Proliferation Kit"
   - badanie indukcji apoptozy z wykorzystaniem fluorescencyjnie znakowanej aneksyny V oraz jodku propidyny
   - badanie indukcji reaktywnych form tlenu z wykorzystaniem „CellROX Green Oxidative Stress Reagent"
   - badanie zmian potencjału błonowego mitochondrium z wykorzystaniem „Cell Meter JC-10 Mitochondrial Membrane Potencjal Assay Kit"
   - badanie faz cyklu komórkowego z użyciem rybonukleazy i jodku propidyny

Instytut Inżynierii Materiałowej
90-924 Łódź, ul. Stefanowskiego 1/15, budynek A18
tel. 42 631 30 30, Sekretariat IV piętro, pok.440
e-mail: inzynieria.materialowa@info.p.lodz.pl, www.mechaniczny.p.lodz.pl

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

- ocena zmian w ekspresji wybranych genów metodą qRT-PCR
- badanie aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB z wykorzystaniem fluorescencyjnie znakowanych przeciwciał oraz metodą ELISA
- analiza statystyczna (test t-Studenta lub one-way ANOVA)

Metody badawcze wybrane zostały racjonalnie dla zrealizowania założonego celu badawczego, w niektórych przypadkach (indukcja apoptozy i aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF-κB) badając ten sam parametr dwukrotnie różnymi testami. Metody opisane są poprawnie a liczba zastosowanych metod badawczych budzi podziw.

W rozdziale Wyniki Doktorantka przedstawiała zestawienie wartości CI_{50} dla poszczególnych badanych analogów w stosunku do komórek nowotworowych (linie komórkowe MCF-7 i HL-60), a dla analogów o najwyższej cytotoksyczności dodatkowo dla komórek prawidłowych (HUVEC i MCF-10A). Na podstawie przedstawionych zestawień do dalszych badań wybrano te analogi, które cechowały się dużą cytotoksycznością w stosunku do komórek linii nowotworowych i stosunkowo niską dla komórek prawidłowych. W grupie α-metyleno-δ-laktonów przebadano 25 analogów, w grupie α-metyleno-γ-laktamów przebadano 21 analogów, a w grupie związków hybrydowych zawierających motyw naftalenodionu było to 10 analogów włączając Doksorubicynę. Łącznie daje to 56 analogów zastosowanych wobec dwóch linii komórkowych. Dodatkowo dla 12 wybranych analogów zbadano cytotoksyczność w stosunku do komórek prawidłowych (HUVEC oraz MCF-10A). Biorąc pod uwagę, że wyznaczenie wartości CI_{50} wymaga wykonania badań dla szeregu stężeń badanych analogów należy stwierdzić, że Doktorantka wykonała ogrom pracy. Jednak już na tym etapie pracy Doktorantka stwierdziła, że: „Niestety badane analogi okazały się mało selektywne." (str. 71).
W następnej kolejności poddano badaniu tylko komórki nowotworowe linii MCF-7 i HL-70 w celu wskazania mechanizmów działania wybranych analogów, także w warunkach synergistycznego współdziałania z lekami przeciwnowotworowymi o znanych mechanizmach działania. Uzyskane wyniki są poprawnie zaprezentowane i interpretowane.

Dyskusja wyników przeprowadzona jest poprawnie z dobrą znajomością literatury. Zaproponowane zostały przypuszczalne molekularne mechanizmy działania związku DL-249 (Rys. 30) i związku 49 (Rys. 31). Wskazano, że związek DL-249 (α-metyleno-δ-lakton) wykazuje działanie synergistyczne na badane komórki nowotworowe MCF-7 w połączeniu taksolem przy braku synergii w połączeniu z oksaliplatyną. Z kolei związek 39 (α-metyleno-γ-laktam) wykazywał synergistyczne działanie z oksaliplatyną oraz 5-fluorouracylem, ale nie z taksolem. Jak widać daleko idące podobieństwo strukturalne obu tych analogów nie skutkuje podobnym efektem synergistycznym. Związek 49 (hybryda naftalenodionu) nie działał synergistycznie z żadnym z użytych leków antynowotworowych.

Dyskusję kończy 6 wniosków, które właściwie pełnią rolę syntetycznego podsumowania dyskusji. Uważam, że Doktorantka powinna na podstawie tego podsumowania sformułować jeden, góra dwa wnioski wypływające z wykonanej pracy badawczej i podkreślające realizację założonego celu.

Instytut Inżynierii Materiałowej
90-924 Łódź, ul. Stefanowskiego 1/15, budynek A18
tel. 42 631 30 30, Sekretariat IV piętro, pok.440
e-mail: inzynieria.materialowa@info.p.lodz.pl, www.mechaniczny.p.lodz.pl

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Ocena przedstawionej mi pracy jest pozytywna, choć w trakcie jej lektury nasunęły mi się pewne krytyczne uwagi o charakterze ogólnym przytoczone poniżej:

- Dla komórek nowotworowych sutka Doktorantka dobrała partnera w postaci prawidłowych komórek epitelialnych sutka, natomiast partnerem dla komórek białaczki miałyby być komórki śródbłonka naczyń krwionośnych. Dlaczego nie dobrano komórek prawidłowych izolowanych z krwi lub śledziony? Z całą pewnością stanowiłyby lepszy materiał porównawczy.
- Po wykonaniu oceny cytotoksyczności i wyznaczeniu wartości CI_{50} Doktorantka stwierdziła, że brak jest selektywnego toksycznego działania badanych analogów na komórki nowotworowe w stosunku do komórek prawidłowych. Dlaczego kontynuowano dalsze kosztowne badania z wybranymi analogami, o których wiadomo było, że są podobnie toksyczne dla komórek nowotworowych i prawidłowych? Czy była to prosta realizacja założonego celu, czy też spodziewano się osiągniecia jakichś innych, niesprecyzowanych w założeniach celów?
- Dlaczego w przypadku α-metyleno-δ-laktonów (Tabela 7) wybrano związek o numerze 4 (DL-249) a nie związek o numerze 6, który był znacznie bardziej toksyczny w stosunku do komórek HL-60 i podobnie silnie toksyczny w stosunku do komórek MCF-7, a zdecydowanie mniej toksyczny w stosunku do komórek prawidłowych?

Mam również uwagi o charakterze szczegółowym:

- Czy aby na pewno system uzdatniania wody firmy Millipore wykorzystuje zjawisko dializy (str. 51)
- Dlaczego w testach nie wykorzystywano DMSO w stężeniu 0,1% jako kontroli negatywnej? Stwierdzenie: „Moje badania wykazały, że w tym stężeniu DMSO nie wywierało wpływu na badane parametry." Jest mało profesjonalne i dalece niewystarczające.
- Czy do wykonywanie rozcieńczeń badanych analogów, wyjściowo rozpuszczonych w DMSO, wykonywano z użyciem DMSO czy też medium lub buforów wykonywanych na bazie wody?

Pomimo przedstawionych powyżej pytań i uwag krytycznych stwierdzam, że praca jest wartościowa i wnosi istotne wartości poznawcze, oraz dokumentuje dobre przygotowanie warsztatowe Doktorantki do owocnej pracy badawczej. Oceniana praca spełnia wymagania stawiane w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku, z późniejszymi zmianami zamieszczonymi w Ustawie z dnia 21 kwietnia 2017 roku.

Przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr Doroty Pomorskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie stopnia doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej.

Dobra Nowiny, 20 września 2017 roku

Bogdan Walkowiak

Instytut Inżynierii Materiałowej
90-924 Łódź, ul. Stefanowskiego 1/15, budynek A18
tel. 42 631 30 30, Sekretariat IV piętro, pok.440
e-mail: inzynieria.materialowa@info.p.lodz.pl, www.mechaniczny.p.lodz.pl

HR EXCELLENCE IN RESEARCH