



Prof. dr hab. Barbara Nawrot
Kierownik Zakładu Chemii Bioorganicznej
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN
Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź
Tel. +48-42-6803248, 604-783945
www.cbmm.lodz.pl

Łódź, 12 października 2017 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Doroty Katarzyny Pomorskiej p.t. „Badania nowych syntetycznych heterocykli jako potencjalnych związków o działaniu przeciwnowotworowym”

Rozprawa doktorska mgr Doroty Pomorskiej została wykonana w latach 2014-2017 w Zakładzie Chemii Biomolekularnej, w Międzywydziałowej Katedrze Chemii i Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Janeckiej (promotor) i dr Katarzyny Gach-Janczak (promotor pomocniczy). Przedmiotem rozprawy są badania podstawowe z zakresu chemii medycznej, których celem jest scharakteryzowanie właściwości przeciwnowotworowych nowych związków heterocyklicznych, zawierających biologicznie aktywne motywy strukturalne.

Zgodnie z wymaganiami Ustawy o tytule i stopniach naukowych z dnia 14 marca 2003 roku (Dziennik Ustaw Nr 65, poz. 595, Art. 13) przedmiotem mojej oceny są następujące elementy Rozprawy:

- A. Ogólna wiedza Kandydatki w uprawianej dziedzinie naukowej
- B. Umiejętność prowadzenia badań naukowych
- C. Oryginalność rozwiązanego problemu naukowego

Przedstawiona do oceny praca (147 stron) ma układ typowy dla prac biologicznych i rozpoczyna się Streszczeniem w języku polskim i angielskim, listą stosowanych symboli i skrótów oraz Wstępem literaturowym (28 stron). Część Doświadczalna składa się z opisu Założeń i Celu pracy, stosowanych Materiałów i Metod (25 stron), Wyników (44 strony) i krótkiej Dyskusji (8 stron). Rozprawę podsumowują Wnioski oraz spis cytowanej literatury (153 odnośniki) i informacje dodatkowe. Omówiony jest także dorobek Doktorantki i lista projektów, w ramach których wykonano badania wchodzące w zakres rozprawy doktorskiej.

Badania będące przedmiotem oceny przeprowadzone zostały w oparciu o nowe związki heterocykliczne, których synteza inspirowana była strukturą związków naturalnych wykazujących właściwości przeciwnowotworowe. Dlatego też w Części Literaturowej Doktorantka przedstawia właściwości związków pochodzenia roślinnego, zawierających motyw α -metyleno- γ -laktonu, stosowanych lub badanych w terapii raka. Na przykładzie seskwiterpenowego laktonu o nazwie „partenolid” (PTL), występującego w liściach złocienia maruna, wyjaśnia mechanizm aktywności alkilującej tej grupy związków w stosunku do

białek komórkowych, polegającej na addycji Michaela reszt merkaptylowych cysteiny do α -metyleno- γ -laktonu. *Tutaj muszę przyznać, że mam wątpliwość co do nazwy związku, ponieważ każdy chemik będzie miał wątpliwość, czy istotnie może zajść addycja reszty alkilo-SH do grupy metylenowej, czy do grupy „metylidenowej” (=CH₂)? Według obowiązującej nomenklatury IUPAC, grupa metylenowa może utworzyć dwa wiązania pojedyncze, zaś metylidenowa jedno wiązanie podwójne.* Kontynuując, Doktorantka omawia też inne właściwości PTL w stosunku do komórek nowotworowych, a mianowicie zdolność do indukcji stresu oksydacyjnego, możliwość zmian powinowactwa czynników transkrypcyjnych do DNA (co w konsekwencji prowadzi do wzrostu lub inhibicji biosyntezy białek pro- i anty-apoptotycznych), oraz do aktywacji/inhibicji czynników sygnałowych i innych funkcjonalnych białek. Nawiasem mówiąc, szczegółowe zapoznanie się z właściwościami PTL przydaje się Doktorantce w części doświadczalnej pracy, ponieważ związek ten stosuje jako czynnik referencyjny w badaniach właściwości przeciwnowotworowych nowych związków z ugrupowaniem α -metyleno- δ -laktonowym i α -metyleno- γ -laktamowym. W następnej części tego rozdziału Doktorantka skupia się na charakterystyce biologicznej naturalnych i syntetycznych naftochinonów i antrachinonów, ich udziale w generowaniu stresu oksydacyjnego w komórce (prowadzącego do apoptozy) oraz na ich cytotoksyczności wynikającej z podatności ugrupowania chinonowego do addycji Michaela biologicznych tioli, podobnie jak czynią to omawiane wcześniej sprzężone laktony. Najważniejszym przedstawicielem tej grupy związków jest doksorubicyna, antybiotyk z rodziny antracyklin o działaniu cytostatycznym, wyizolowany ze szczepu bakteryjnego *Streptomyces peucetius*. Doktorantka podkreśla specyficzny mechanizm aktywności tego związku polegający przede wszystkim na hamowaniu aktywności topoizomerazy II. Nie bez znaczenia są też interkalujące właściwości doksorubicyny w stosunku do cząsteczki dwuniciowego DNA, prowadzące do zahamowania syntezy zarówno DNA jak i RNA i, w konsekwencji, do zahamowania proliferacji komórek. Część literaturową kończy krótka charakterystyka linii komórkowych, zastosowanych w badaniach wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej.

Pomimo, że zasadniczo cała Rozprawa napisana jest dosyć przejrzysto i starannie, to jednak we wstępie literaturowym Doktorantka nie ustrzegła się błędnych sformułowań, które wymagają sprostowania. Uwagi krytyczne dotyczą (1) niepoprawnych nazw reaktywnych form tlenu (Rys. 6) („anionorodnik ponadtlenkowy” a nie „anion superoksydowy”, oraz „jon nadtlenkowy” a nie „nadtlenek”). (2) Polski skrót reaktywnych form tlenu to RFT a nie stosowany tutaj powszechnie ROS. (3) Opis stanu redoks komórki jest dalece nieprecyzyjny – co znaczy sformułowanie, że „przestrzeń zewnątrzkomórkowa jest w formie bardziej utlenionej niż wewnątrz komórki”? (4) Błędnie opisano zjawisko interkalacji doksorubicyny do DNA, jako interkalacja między nici DNA (str. 36). Podobny błąd wkraść się też w części Materiały i Metody (str. 57), gdzie napisane jest, że „fluorescencyjne addukty powstają wskutek interkalacji jodku propidyny do komplementarnych zasad”. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie tej kwestii podczas publicznej obrony Rozprawy Doktorskiej. Tym nie mniej, pomimo tych krytycznych uwag, stwierdzam, że część literaturowa dobrze wprowadza czytelnika w obszar badań zawartych w dysertacji i świadczy o posiadanej przez Doktorantkę ogólnej wiedzy w uprawianej dziedzinie naukowej.

Głównym celem badań wchodzących w skład Rozprawy doktorskiej była ocena profilu aktywności przeciwnowotworowej nowych, oryginalnie zsyntetyzowanych związków organicznych, a następnie wyselekcjonowanie kandydatów o potencjalnych właściwościach terapeutycznych do bardziej zaawansowanej analizy ich wpływu na wybrane procesy

zachodzące w komórkach nowotworowych. Badania te zostały wykonane w ramach współpracy Zespołu Prof. Anny Janeckiej z badaczami z Instytutu Chemii Organicznej, Politechniki Łódzkiej, pracującymi pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Tomasza Janeckiego, którzy zaprojektowali i zsyntetyzowali związki będące przedmiotem Rozprawy.

Do badań wykorzystano łącznie 55 związków, z trzech serii: α -metyleno- δ -laktonów (seria I, związki 1-25), α -metyleno- γ -laktamów (seria II, związki 26-46) i pochodnych naftalenodionu (seria III, związki 47-55). Wstępną ocenę cytotoksyczności związków przeprowadzono na dwóch liniach komórek nowotworowych, a mianowicie linii HL-60 (ludzkiej białaczki promielocytowej) i MCF-7 (raka piersi). Dla wyselekcjonowanych przedstawicieli każdej z serii przeprowadzono badania cytotoksyczności względem komórek prawidłowych HUVEC (ludzkich komórek - a nie linii - śródbłonna naczyniowego żyły pępowinowej) i unieśmiertelnionej linii ludzkich komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego MCF-10A (choroba zwłóknienia gruczołu piersiowego). W zasadzie wszystkie badane związki o najniższej wartości parametru IC_{50} okazały się być mało selektywne i były toksyczne także dla komórek prawidłowych. Najwięcej uwagi Doktorantka poświęciła związkowi nr. 4 z serii I, oznaczonemu alternatywnie jako DL-249. Interesuje mnie, dlaczego ten właśnie związek był wyselekcjonowany do dalszych badań, podczas gdy np. związki 9, 14 i 19 wykazywały cytotoksyczność na zbliżonym, a w niektórych przypadkach na nawet wyższym poziomie (mniejsza wartość IC_{50}). Wykorzystując specyficzne przeciwciała anti-BrdU Doktorantka wykazała silny hamujący wpływ związku DL-249 na proliferację komórek HL-60 i MCF-7, spowodowany uszkodzeniami DNA (test H2AX), wywołującymi w konsekwencji apoptozę komórek (test PARP). Stosując cytometryczną analizę fluorescencyjnie barwionych komórek (aneksyna V-FITC i jodek propidyny), określiła rozkład komórek wczesno- i późno-apoptotycznych w obu nowotworowych liniach komórkowych w porównaniu do rozkładu pod wpływem wzorcowego PTL. Tę samą technikę cytometrii przepływowej zastosowała do zbadania zdolności DL-249 do generowania reaktywnych form tlenu w komórkach HL-60 i MCF-7. Użyła tutaj fluorescencyjny barwnik CellROX, a rolę kontroli pozytywnej pełnił menadion, silny induktor wolnych rodników. Cytometrycznie wykazała powstawanie RFT, szczególnie w linii MCF-7, podczas gdy efekt ten był bardzo słaby w linii HL-60. Ponadto, wykazała obniżony potencjał błony mitochondrialnej komórek obu badanych linii po podaniu DL-249 w porównaniu do działania kontrolnego PTL. Najbardziej interesujące wyniki w tej serii uzyskała z badań nad wpływem DL-249 na cykl komórkowy i poziom ekspresji wybranych genów apoptozy. Znalazła korzystną właściwość DL-249 polegającą na obniżaniu poziomu ekspresji genów anti-apoptotycznych i podwyższaniu poziomu ekspresji genów pro-apoptotycznych, co przekłada się na skłonność komórek do apoptozy. Wykazała, że diagnostyczny jest tutaj podwyższony stosunek ilości mRNA białka Bax do mRNA białka Bcl-2. Wykazała, że śmierć komórki następuje na szlaku mitochondrialnym, po zahamowaniu aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Poznanie molekularnych szlaków indukcji apoptozy jest zasadnicze dla funkcjonalnej oceny potencjalnych leków w terapii raka. W związku z badaniami poziomu ekspresji wybranych genów mam pytanie odnośnie wyboru kaspaz 3 i 9, czyli, co właściwie było badane? Według mnie określono poziom mRNA prokaspaz, a *de facto* powinno się ocenić aktywność dojrzałych kaspaz (pomiar na poziomie białka). Mam także kolejne pytanie: czy badana była aktywność kaspazy 8, świadczącej o egzogennym (receptorowym) szlaku indukcji apoptozy, ponieważ można sobie wyobrazić, że równocześnie obydwie szlaki są indukowane przez testowane związki.

W drugiej serii 12 związków o strukturze α -metyleno- γ -laktamów z dodatkowym atomem azotu w pierścieniu Doktorantka wyselekcjonowała związek nr. **39**, z dwoma podstawnikami fenyłowymi w pozycjach R2 i R3 oraz grupą winylową w pozycji R1. I tutaj znów mam pytanie, dlaczego nie wybrano związku **40**, który wykazuje w dwóch przypadkach niższy IC_{50} niż związek **39** w stosunku do komórek MCF-7 i MCF-10A? Dla wyselekcjonowanego związku przeprowadzono badania jego wpływu na proliferację, uszkodzenia DNA oraz apoptozę komórek MCF-7. Wykazano, że związek ten wywołuje efekty słabsze niż referencyjny PTL. Natomiast interesujące okazało się synergiczne działanie związku **39** i oxaliplatyny oraz 5-FU w teście na generowanie RTF w komórkach MCF-7.

Finalnie, w serii III, spośród 9 związków z grupy pochodnych naftochinonu modyfikowanego dodatkowym pierścieniem pirolu lub furanu, oraz grupą fosfonianową w pozycji β , na podstawie badań cytotoksyczności wyselekcjonowano związek **49**, aczkolwiek równie aktywny okazał się związek **51**, który zawierał dodatkowo atom fluoru w podstawniku pirydylowym na atomie azotu pierścienia pirolu. Jakże były przesłanki do rezygnacji z przebadania, w moim oglądzie bardziej interesującego, związku **51**? Pytam, ponieważ wiadomo, że atomy fluoru często wpływają korzystnie na właściwości biologiczne związków organicznych (np., 5-fluorouracyl, paliperydon, flumazenil). Dla wyselekcjonowanego związku **49** przeprowadzono cykl badań, mających na celu określenie jego potencjału do indukcji apoptozy komórek nowotworowych. W badaniach tych zaobserwowano zahamowanie proliferacji komórek HL-60 i MCF-7, indukcję uszkodzeń DNA i śmierć komórek na drodze apoptozy. Ponadto, w porównaniu do komórek kontrolnych wzrosła zdecydowanie ilość generowanych reaktywnych form tlenu, co wskazuje na mechanizm działania związku **49** poprzez wywoływanie stresu oksydacyjnego. Konsekwencją tej aktywności było zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie sub. G₀/G₁ i S (HL-60) lub w fazie G₀/G₁ w komórkach MCF-7 i indukcja apoptozy na drodze mitochondrialnej.

W Dyskusji Doktorantka szczegółowo przeanalizowała możliwe ścieżki indukcji śmierci komórki na skutek działania związku DL-249 (Rys. 30), poprzez (i) zahamowanie aktywności białka NF- κ B, co wpływa na zahamowanie transkrypcji genów anty-apoptotycznych; (ii) indukcję RFT, zmianę potencjału błonowego mitochondriów, uwalnianie cytochromu c i aktywację apoptosomu, oraz (iii) uszkodzenia DNA prowadzące do zmiany poziomu ekspresji genu p53 (strażnika genomu) i zatrzymanie cyklu komórkowego. Pomimo, że Doktorantka ma świadomość, że obecność motywów strukturalnych takich jak egzocykliczna grupa metylenowa sprzężona z grupą karbonylową czy też ugrupowanie naftochinonu powoduje w komórce aktywację wielu szlaków metabolicznych, to jednak w Rozprawie zabrakło mi pogłębionej analizy pomiędzy strukturą i aktywnością biologiczną badanych połączeń, tzw. analizy SAR. Nie zastanowiono się nad wpływem poszczególnych elementów strukturalnych badanych połączeń na obserwowane właściwości biologiczne w poszczególnych typach komórek. Nie podsumowano, czy przebadane związki stanowią atrakcyjne obiekty do dalszych badań przedklinicznych, aczkolwiek stwierdzono, że związki syntetyczne mogą w przyszłości zastąpić związki naturalne o właściwościach przeciwnowotworowych, izolowane z roślin lub kultur bakteryjnych.

W podsumowaniu, pragnę stwierdzić, że Doktorantka wykazała się znajomością diskutowanych zagadnień i umiejętnością prowadzenia badań naukowych na wysokim poziomie. Zna szereg metod biologii molekularnej i komórkowej, opartych o pomiary fluorescencji (cytometria przepływowa, RT-PCR w czasie rzeczywistym). Swobodnie porusza się w obszarze badań na ludzkich komórkach nowotworowych. Zna metody określania

aktywności metabolicznej komórek po podaniu związku, umie przeanalizować poziom reaktywnych form tlenu w komórce. Posługuje się metodologią pozwalającą na ocenę rodzaju śmierci komórki, faz cyklu komórkowego, uszkodzeń DNA. Zademonstrowała także umiejętności oceny potencjału błonowego mitochondrium. Wykazała się znajomością prowadzenia testów kolorymetrycznych (test cytotoxyczności MTT). Zastosowała odpowiednie metody analizy statystycznej otrzymanych wyników.

Moje uwagi wymieniłam już wcześniej, w trakcie omawiania poszczególnych fragmentów Rozprawy. W tym miejscu pragnę zwrócić uwagę na kilka drobnych nieścisłości które wymagają korekty, a mianowicie w wykresach 1,14,17,22 pokazujących wpływ związków na proliferację komórek badany testem z BrdU - niepoprawnie opisana oś y (nie „wbudowywanie” a „ilość” w (%) lub „% populacji” komórek z BrdU); badania „poziomu” ekspresji genów, a nie badania ekspresji genów (str. 83); niezręczny opis „zahamowanie aktywności NF- κ B ... na poziomie ekspresji genu, jak i na poziomie białka”. Preferuję też zastąpienie zwrotu „przy użyciu” na „ z wykorzystaniem / za pomocą”. Pominę uwagi dotyczące drobnych potknięć stylistycznych i edytorskich. Natomiast podkreślam, że praca napisana jest przejrzysto i starannie. Nie mam generalnie uwag co do jakości przedstawionych rysunków, jednak w przypadku rys. 21-24,25 i 26 lepiej byłoby nazwać je „rycinami”. Spis literatury zawiera jedynie kilka nieścisłości (np. niepoprawnie cytowane odnośniki 110 i 115). Uwagi te nie umniejszają wartości merytorycznej samej Rozprawy.

Doktorantka jest współautorką ośmiu publikacji oryginalnych i dwóch prac przeglądowych opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej o dobrym IF (łącznie >27 punktów), w trzech jako pierwszy autor. Jest to dorobek świadczący o dużym zaangażowaniu Doktorantki w prowadzone badania naukowe.

Reasumując, na podstawie przedstawionych powyżej osiągnięć stwierdzam, że Doktorantka wykazała się ogólną wiedzą w uprawianej dziedzinie nauki, umiejętnością prowadzenia badań naukowych i oryginalnością rozwiązane go problemu naukowego.

Z całym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w Ustawie i wnioskuję do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Doroty Pomorskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Barbara Nawrot

Łódź, 12 października 2017 r.