



## OCENA

pracy doktorskiej Pani mgr Angeliki Długosz-Pokorskiej, zatytułowanej: „*Badanie aktywności przeciwnowotworowej i molekularnych mechanizmów działania hybrydowych pochodnych naftalenodionów i kumaryny*”. Ocena wykonana została na zlecenie Dziekana Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Pani Profesor Agnieszki Wierzbowskiej.

Przedstawiona mi do recenzji praca wykonana została w Zakładzie Chemii Biomolekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Anny Janeckiej. Praca finansowana była z grantów:

- Opus NCN nr 2012/07/B/ST5/0-2006, pt. „*Synteza biologicznie ważnych 2-alkilideno-1-oksoheterocykli z wykorzystaniem reagentów Hornera-Wadswortha-Emmons’a*”, kierowany przez Prof. dr hab. inż. Tomasza Janeckiego;
- Projekt własny, finansowany przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi nr 502-03/1-156-02/502-14-300, w ramach finansowania młodych pracowników nauki i studentów studiów doktoranckich pt. „*Nowe analogi heterocykliczne jako związki o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym*”.
- badania statutowe Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Praca obejmuje 113 stron, włączając w to 1 schemat, 13 nieponumerowanych schematów strukturalnych związków chemicznych, 7 rysunków, 1 tabelę, 134 pozycje literatury, 6 kopii prac, z czego 4 oryginalne i 2 przeglądowe, 7 oświadczeń współautorów, streszczenia w języku polskim i angielskim. Sama rozprawa doktorska zawiera się na 34 stronach manuskryptu zawierającego: Wstęp literaturowy, Założenia i cel pracy, Wyniki i Wnioski. W rozdziale Wyniki Autorka odwołuje się do opublikowanych prac oryginalnych i przeglądowych.

Choroby nowotworowe uznawane są za jedną z głównych przyczyn zgonów w krajach rozwiniętych i jest to wystarczający powód, aby chorobom tym poświęcić duże nakłady finansowe oraz uwagę pracowników nauki. Ze stanem takim zgadza się Doktorantka pisząc we wprowadzeniu, że: „*Walka z chorobami nowotworowymi jest jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny.*” Ale już w kolejnym zdaniu znajduje się stwierdzenie: „*Pomimo stosowania nowych metod badawczych, leczniczych i zapobiegawczych nadal nie osiągnięto znacznego postępu w ich zwalczaniu.*”, z którym to zdaniem trudno się zgodzić, bo osiągnięto znaczące postępy w walce z tą chorobą i niektóre rodzaje nowotworów złośliwych poddają się skutecznej terapii, o ile zostaną wykryte w stosunkowo wczesnym stadium. Niestety, dla niektórych rodzajów nowotworów w dalszym ciągu rokowania są bardzo poważne. Jako jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy należy przyjąć, że pod wspólnym pojęciem chorób nowotworowych mieszczą się bardzo różne nowotwory. Ich cechą wspólną jest niekontrolowany przez organizm rozrost tkanki nowotworu ale znacząco różnią się przyczyną powstania, mechanizmami funkcjonowania i unikania zniszczenia przez układ odpornościowy, a także inwazyjnością. Należałoby mówić o różnych jednostkach chorobowych, które wymagają

zróżnicowanej strategii terapeutycznej dla osiągnięcia sukcesu w ich zwalczaniu. Z tego powodu bardzo potrzebne są nowe związki chemiczne wykazujące selektywnie efekty toksyczne w stosunku do komórek różnych rodzajów nowotworów, przy akceptowalnym ryzyku ich wpływu na prawidłowe komórki organizmu. Dlatego zainteresowanie Doktorantki nowymi syntetycznymi analogami naturalnie występujących substancji o toksycznym działaniu na komórki ulegające intensywnemu podziałowi należy uznać za dobrze wpisujące się w aktualny trend badawczy walki z chorobami nowotworowymi.

Manuskrypt rozpoczyna się bardzo krótkim wprowadzeniem, a następnie krótko scharakteryzowane są procesy naprawcze DNA w komórkach. Kolejny podrozdział opisuje transportery błonowe wykorzystywane w komórkach do przenoszenia przez błonę komórkową różnych substancji, a wykorzystywanych przez komórki nowotworowe do wypracowania oporności na liczne substancje lecznicze. Przedstawiona została charakterystyka transporterów błonowych ABC z ich podziałem na podrodziny, a następnie wskazane zostały możliwe przyczyny regulacji ekspresji tych transporterów w komórkach nowotworowych oraz omówiony został hipotetyczny mechanizm wykorzystania transporterów do usuwania leków z wnętrza komórki, a inhibicję ich działania wskazano jako potencjalny mechanizm walki z opornością lekową komórek nowotworowych.

W tym miejscu chciałbym zapytać, dlaczego uniwersalne procesy naprawcze DNA w tytule omawianego podrozdziału zostały przyporządkowane tylko komórkom nowotworowym (2. *Procesy naprawcze DNA w komórkach nowotworowych*, str.7)?

Drugi rozdział rozprawy to założenia i cel pracy, w którym Doktorantka zawarła dobrze uzasadnione powody zainteresowania pochodnymi naftalenodionu i kumaryny, jako potencjalnymi lekami antynowotworowymi, co wyczerpuje wyjaśnienie założeń planowania i przeprowadzenia badań. Niestety, tak dobrze nie jest już z przedstawieniem celu pracy. Czytając ten fragment manuskryptu trudno nie odnieść wrażenia, że celem jest uzasadnienie oparcia rozprawy doktorskiej na dotychczas opublikowanych pracach, a nie spójne przedstawienie celu naukowego i wskazanie dróg jego osiągnięcia. Próżno doszukiwać się akapitu precyzującego cel pracy, natomiast znaleźć można wyszczególnienie „celów szczegółowych” podzielonych na dwie części odpowiadające:

- jednej publikacji opisującej aktywność antynowotworową związków oznaczonych numerami 8a i 12a badaną z wykorzystaniem komórek nowotworowych wątroby linii HepG2
- trzech publikacji opisujących aktywność antynowotworową związku oznaczonego jako AD-013 z wykorzystaniem komórek nowotworu sutka linii MCF7 oraz nowotworu ostrej białaczki promielocytarnej linii HL-60.

Można odnieść wrażenie, że przedstawiony mi do oceny manuskrypt w części dotyczącej celu pracy stanowi raczej opowiadanie o tym, co zawierają załączone prace niż syntetyczne sformułowanie celu pracy.

Manuskrypt nie zawiera opisu metod badawczych wykorzystanych w pracy. Widać Autorka rozprawy uznała, że metody te są wystarczająco dobrze opisane w kopiach opublikowanych prac. Podobnie opis wyników ogranicza się do krótkiego sprawozdania z zawartości załączonych prac.

Jak przedstawiłem to powyżej, oceniana rozprawa zawiera oświadczenia współautorów publikacji, ale nie wszystkich. Niestety, brakuje takiego oświadczenia ze strony Pana dr inż. Dariusza Deredasa, adiunkta w Instytucie Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej, współautora trzech prac dotyczących

związku AD-013. Poproszę Doktorantkę o przedstawienie stosownego oświadczenia współautora, najpóźniej w trakcie trwania publicznej obrony.

W załączonych kopiach prac oryginalnych rzeczywiście zawarty jest opis zastosowanych metod badawczych i laboratoryjnych, wliczając w to:

- syntezę badanych związków chemicznych;
- hodowlę komórkową;
- test przeżywalności MTT;
- ilościową analizę RT-PCR;
- test proliferacji, apoptozy i uszkodzeń DNA z wykorzystaniem cytometrii przepływowej;
- testy ELISA;
- Western immunoblotting;
- test aktywacji NF- $\kappa$ B metodą cytometrii przepływowej;
- test oporności wielolekowej;

W zdecydowanej większości metody badawcze oparte były o zwalidowane, komercyjnie dostępne testy, co w znacznej mierze uwiarygodnia uzyskane wyniki i to jest mocną stroną prezentowanych wyników, które zostały zresztą opublikowane, po wcześniejszej akceptacji recenzentów będących ekspertami w tej dziedzinie. Dlatego moje niżej zamieszczone pytania i uwagi w żadnym stopniu nie mają na celu podważania opublikowanych już prac. Nieco inaczej patrzy się na zaprezentowane w pojedynczym doniesieniu naukowym wyniki i ich dyskusję, a inaczej odbiera się wyniki zbiorcze opublikowane w kilku pracach. Przystępując do czytania manuskryptu pracy doktorskiej miałem dużą nadzieję, że znajdę w nim przekrojową analizę wyników wraz z późniejszą ich syntezą wspartą wnioskami. Tymczasem w mojej ocenie Doktorantka dostarczyła polskojęzyczne skrótowe sprawozdanie z opublikowanych prac zakończone zbiorem wniosków noszących znamiona sztywnego podziału wynikającego z tych opublikowanych prac. Nie znalazłem pogłębionej dyskusji wyników i oceny w jakim stopniu osiągnięty został cel pracy, cel, którego w pracy w sposób jawny nie sformułowano, a dyskusji nie przedstawiono.

Umiejętność sformułowania celu pracy, dokonania analizy i syntezy wyników, oraz logicznego wnioskowania końcowego świadczy o dojrzałości naukowej badacza. Dlatego poproszę Doktorantkę, o sprecyzowanie celu pracy, wskazanie najważniejszego osiągnięcia badawczego oraz sformułowanie końcowego wniosku wypływającego z przedstawionych wyników.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam też kilka uwag i komentarzy do opublikowanych prac.

1. W charakterze ogólnego komentarza pozwolę sobie zauważyć, że z faktu toksycznego wpływu badanej substancji na komórki nowotworowe nie można i nie należy wyciągać wniosków o antynowotworowym potencjale tej badanej substancji. Nawet uwzględniając wyższy potencjał metaboliczny i większą szybkość podziałów komórek nowotworowych, należy zawsze wykazać, że komórki prawidłowe mają szansę przeżyć kontakt z tą badaną substancją. Dlatego nie jest dla mnie zrozumiałe dlaczego w pracy oznaczonej numerem 1 badania przeprowadzono tylko na linii komórkowej HepG2 bez uwzględnienia prawidłowych komórek wątroby. Co prawda w trzech pozostałych pracach w teście MTT porównano przeżywalność komórek nowotworowych i prawidłowych, ale w pracy z numerem 2 nieadekwatnie dobrano prawidłowe komórki śródbłonna naczyniowego HUVEC jako partnera komórek nowotworowych białaczki HL-60. Zresztą z tabeli 2 zamieszczonej w tej pracy wynika wyższa toksyczność związku AD-013 w stosunku do komórek HUVEC niż w stosunku do komórek HL-60 ( $IC_{50}$  odpowiednio  $8,0 \pm 0,3$  i  $12,0 \pm 0,4$   $\mu$ M). Autorzy pracy stwierdzają jednak, że różnice te są nieistotne, na jakiej podstawie?

2. Nie jest jasne dlaczego w pracy 1 ekspresja genu GAPDH potraktowana została jako kontrola. Zwykle gen ten, lub inne konstytutywne geny (housekeeping genes), wykorzystywane są do normalizacji wyników ekspresji badanych genów dającej możliwość porównania ekspresji genów w różnych eksperymentach. Jako kontrolę stosuje się zwykle komórki nie poddane działaniu stresu wynikającego z ekspozycji do badanej substancji. Porównanie z kontrolą w takiej sytuacji to porównanie ze znormalizowaną wobec genu konstytutywnego wartością ekspresji danego genu w komórkach kontrolnych i w komórkach poddanych badanemu stresowi.

3. W pracy nr 1 brak jest w tabeli 1 startera dla genu kodującego MMP9, dla którego wyniki z analizy RT-PCR prezentowane są na rysunku 5.

4. Dlaczego badanie wpływu badanych substancji na komórki prawidłowe zakończono na poziomie ich przeżywalności i we wszystkich pozostałych testach nie badano odpowiedzi komórek prawidłowych? Czy brak tej informacji nie utrudnia, a może i uniemożliwia, prawidłową interpretację wyników uzyskanych dla komórek nowotworowych?

Załączone do manuskryptu kopie dwóch prac przeglądowych stanowią bardzo ciekawe opracowanie dotyczące mechanizmów molekularnych możliwych do wykorzystania w zwalczaniu komórek nowotworowych a także mechanizmów oporności lekowej komórek nowotworowych i są z całą pewnością bardzo dobrym teoretycznym wstępem do ocenianej pracy doktorskiej.

Pomimo przedstawionych powyżej pytań i uwag krytycznych stwierdzam, że praca jest wartościowa i wnosi istotne wartości poznawcze, oraz dokumentuje dobre przygotowanie warsztatowe Doktorantki. Na podstawie przedstawionych oświadczeń współautorów uważam, że poniesiony przez Doktorantkę wysiłek i wkład pracy upoważniają ją do wykorzystania przedstawionych prac jako podstawy rozprawy doktorskiej. Wobec powyższego 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 Angeliki Długosz-Pokorskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dobra Nowiny, 27 marca 2019 roku

Beata Wallońska