



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

Łódź, 25 kwietnia 2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Angeliki Długosz-Pokorskiej p.t. „Badania aktywności przeciwnowotworowej i molekularnych mechanizmów działania hybrydowych pochodnych naftalenoidów i kumaryny”

Rozprawa doktorska mgr Angeliki Długosz-Pokorskiej została wykonana w latach 2015-2019 w Zakładzie Chemii Biomolekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Janeckiej. Przedmiotem rozprawy jest zbadanie aktywności przeciwnowotworowej grupy nowych związków heterocyklicznych i poznanie mechanizmów ich działania, prowadzących do uszkodzenia komórek nowotworowych. Moja ocena dotyczy ogólnej wiedzy teoretycznej Kandydatki w uprawianej dyscyplinie naukowej, a także oryginalności problemu naukowego oraz samodzielności jego rozwiązania przez Doktorantkę.

Przedstawiona do oceny rozprawa oparta jest na materiale doświadczalnym opisanym w czterech oryginalnych pracach naukowych, opublikowanych w *Acta Biochim. Pol.* (2017), *Anticancer Agents Med. Chem.* (2018), *Mol. Biol. Rep.* (2018) i *Pharmacol. Chem.* (2018) oraz w dwóch pracach przeglądowych opublikowanych w *Mini Rev. Med. Chem.* (2017) i *Curr. Pharm. Design* (2016). Z przyjemnością skonstatowałam, że we wszystkich tych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a z dołączonych oświadczeń współautorów wynika, że udział Doktorantki w powstaniu prac oryginalnych był wiodący i polegał na zaprojektowaniu, i wykonaniu wszystkich eksperymentów „biologicznych” oraz opracowaniu zebranych wyników. Z oświadczenia Pani Prof. Anny Janeckiej wynika, że jej rolą była konsultacja wyników i pomoc w pisaniu manuskryptów, aczkolwiek we wszystkich wspomnianych wyżej publikacjach prof. Janecka jest autorem do korespondencji. Zatem Doktorantka wniosła również wiodący wkład w powstanie obydwu dwuautorskich prac przeglądowych, polegający na analizie literatury przedmiotu i opracowaniu faktograficznym materiału do obu przeglądów. W rozprawie jest także 50-stronicowe omówienie zawierające wstęp literaturowy, wyniki i wnioski wynikające z przeprowadzonych badań, a poparte 134 odsyłaczami do literatury.

W ostatnich latach, dzięki rozwojowi wiedzy na temat molekularnych podstaw procesów nowotworzenia, zaproponowano szereg nowych, bardziej skutecznych podejść w terapii nowotworów. Obecnie prowadzone prace badawcze rozwijają się w kilku równoległych kierunkach. Z jednej strony skupiają się na poszukiwaniu związków działających bezpośrednio na komórki nowotworowe i ich otoczenie, a więc wpływające na cykl komórkowy, proliferację czy śmierć komórki. Z drugiej strony, poznanie immunologii nowotworów oraz odpowiedzi układu odpornościowego na obecność komórek nowotworowych pozwoliło na opracowanie tzw. immunoterapii nowotworów, polegającej na pobudzaniu układu immunologicznego do niszczenia komórek nowotworowych. Kolejnym z proponowanych rozwiązań jest tzw. terapia genowa skierowana na naprawę defektów genetycznych, niszczenie komórek nowotworowych poprzez wprowadzanie do ich genomu nowych genów, lub na hamowanie aktywności genów zaangażowanych w procesy nowotworzenia. Oceniana

rozprawa wpisuje się w ten pierwszy nurt badań, a więc w poszukiwanie związków działających bezpośrednio na komórki nowotworowe i ich otoczenie.

Głównym celem badań było oznaczenie profilu aktywności przeciwnowotworowej nowych związków organicznych, a następnie wyselekcjonowanie tych o potencjalnych właściwościach terapeutycznych do bardziej zaawansowanej analizy ich wpływu na wybrane procesy zachodzące w komórkach nowotworowych. Badania 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. Zespół chemików z PŁ zaprojektował i zsyntetyzował dwie serie związków opartych na szkielecie naturalnych farmakoforów, naftochinonów i dihydrokumaryny, zawierających dodatkowe elementy strukturalne istotne dla zwiększenia ich aktywności biologicznej. W przesiewowych badaniach cytotoksyczności (test MTT) w liniach komórkowych ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej (HL-60) i limfoblastycznej (NALM-6), Doktorantka wyselekcjonowała trzy związki o najbardziej obiecujących właściwościach. Wyniki badań przesiewowych nie zostały opisane w załączonych publikacjach, a jedynie skąpa informacja na ten temat została zamieszczona w tekście omówienia.

Celem dalszych badań było oznaczenie właściwości przeciwnowotworowych wyselekcjonowanych związków, w tym m.in. zbadanie ich wpływu na proliferację wybranych komórek nowotworowych, procesy apoptozy, generowanie reaktywnych form tlenu i uszkodzeń DNA, a także na oporność wielolekową. **Doktorantka przeprowadziła zaplanowane badania i osiągnęła założone cele ze znakomitą skutecznością, co świadczy o spełnieniu warunków stawianych kandydatom do stopnia doktora.**

I tak w **pracy nr. 1** (*Acta Biochim. Pol.*) Doktorantka wykazała, że trzy spośród 6 zbadanych fosfopochodnych naftochinonów (8a, 8c i 12a) są cytotoksyczne w stosunku do ludzkich komórek nowotworu wątroby HepG2 (IC_{50} w granicach 4,13-6,00 μ M), jednak do dalszych, szczegółowych badań wybrała tylko dwa (8a i 12a). Pytanie: jakie były przesłanki takiego wyboru? Następnie, wykazała się umiejętnością analizy poziomu ekspresji wybranych genów za pomocą techniki PCR w czasie rzeczywistym oraz wykorzystania techniki cytometrii przepływowej do analizy procesów zachodzących w komórkach. Za pomocą wspomnianych metod wskazała, że obydwa związki indukują proces apoptozy, hamują procesy przerzutowania i generują uszkodzenia DNA, oraz, że związek 8a (zawierający resztę chlorofenylową) jest znacznie bardziej genotoksyczny niż 12a. Doktorantka poprawnie wybrała typ testów użytych do analizy statystycznej wyników. Co więcej, wraz ze współautorami, zaproponowała szlak indukcji apoptozy poprzez aktywację ścieżki sygnałowej MAPK, zachodzący w komórkach Hep6 pod wpływem związku 8a. Jedyną uwagę jaką mam odnośnie tej pracy dotyczy braku informacji o rodzaju kontroli jakie zostały zastosowane w eksperymentach, których wyniki przedstawiono na Fig. 8-10. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie tej kwestii podczas publicznej obrony rozprawy.

Pozostałe trzy prace oryginalne dotyczą badań przeprowadzonych na nowym związku hybrydowym AD-013 o szkielecie dihydrokumaryny (chromanonu) z motywem α -metylideno- δ -laktonu. W pierwszej z nich (*ACAMC*, **praca nr. 2**) Doktorantka wykazała znacznie wyższą (20-30-krotną) cytotoksyczność badanego związku w liniach komórkowych ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej (HL-60) i raka piersi (MCF-7) w porównaniu do związku referencyjnego, jakim w tym przypadku był lek przeciwnowotworowy o nazwie „nowobiocyna”. Należy zauważyć, że Doktorantka wraz ze swoją Promotorką, Panią Profesor Anną Janecką, opublikowała artykuł przeglądowy na temat analogów nowobiocyny jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych (*Mini-Rev. Med. Chem.*, **praca nr. 5**) i praca ta jest włączona do dorobku rozprawy. Wracając do oceny problemu naukowego, Doktorantka wykazała, że badany związek AD-013 jest „w pewien sposób” (proszę o wyjaśnienie co Autorka miała na myśli) selektywny w stosunku do nienowotworowej linii komórkowej nabłonka gruczołu piersiowego (MCF-10A) oraz w stosunku do ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC). Warto zaznaczyć, że w pracy tej Doktorantka słusznie zdefiniowała test MTT jako test aktywności metabolicznej komórki, mierzący poziom aktywności dehydrogenaz komórkowych

(Materials and Methods punkt 2.3), z tym, że bardziej precyzyjne byłoby tutaj wskazanie, że chodzi o mitochondrialną dehydrogenazę bursztynianową. W badaniach wpływu AD-013 na metabolizm komórek MCF-7 i MCF-10 oznaczyła poziom ekspresji wybranych genów pro- i antyapoptotycznych oraz genów regulujących cykl komórkowy. Określiła także tempo proliferacji komórek (za pomocą testu z BrdU), poziom indukcji apoptozy, oraz wpływ związku na uszkodzenia DNA. Doktorantka wykazała istotną różnicę w mechanizmie działania AD-013 w komórkach raka piersi MCF-7 w porównaniu do komórek białaczkowych HL-60 i zaproponowała możliwe szlaki indukcji apoptozy w obu rodzajach badanych komórek. Kolejna oryginalna **praca nr. 3** (*Mol. Biol. Rep.*) stanowi rozwinięcie wyżej omówionych badań i dotyczy analizy szlaków odpowiedzi komórek MCF-7 na uszkodzenia DNA pod wpływem AD-013. Doktorantka wywiązała się znakomicie z tego zadania, wykazując za pomocą analizy PCR w czasie rzeczywistym zwiększony poziom mRNA białek szlaku odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA, w tym kinaz ATR i ATM, oraz obniżony poziom ekspresji genu kodującego białko BRCA1, zaangażowane w naprawę DNA. Ten ostatni wynik Doktorantka potwierdziła testem ELISA. Wykazała także ponad trzynastokrotny wzrost poziomu białka p53 (techniką Western blot) pod wpływem związku AD-013, co świadczyło o uruchomieniu szlaku apoptozy i śmierci komórek nowotworowych.

W przeglądzie literatury Doktorantka najwięcej uwagi poświęciła zagadnieniom związanym z mechanizmami oporności wielolekowej w komórkach rakowych, będącej przyczyną obniżonej skuteczności terapii przeciwnowotworowych. Swoją uwagę skupiła na białkach z rodziny ABC funkcjonujących jako transportery błonowe. Wraz ze swoją Promotorką opublikowała w czasopiśmie *Curr. Pharm. Des.* artykuł przeglądowy (**praca nr. 6**) poświęcony zagadnieniom mechanizmu wyrzutu leków z komórki, drzewa filogenetycznego rodziny białek ABC, podtypów białek ABC, ich funkcji i schematycznej struktury pod względem lokalizacji domen transbłonowych oraz miejsc wiązania nukleotydu. Sporo uwagi poświęciła też omówieniu zagadnień regulacji ekspresji genów transporterów z rodziny ABC w różnych komórkach nowotworowych, analizując możliwości ograniczania procesu MDR. Tutaj mam pytanie. Jak w opinii Doktorantki wygląda sprawa blokowania procesu MRD? Czy lepszy skutek osiągniemy poprzez obniżanie poziomu ekspresji białek ABC czy poprzez blokowanie ich aktywności? Odpowiedź na to pytanie jest po części zawarta w **pracy nr. 4**, w której Doktorantka określiła wpływ AD-013 oraz dwóch innych związków zawierających ugrupowanie α -metylideno- γ -laktonowe na procesy metaboliczne zachodzące w komórkach raka piersi (MCF-7), w tym na przeżywalność komórek, poziom ekspresji genów transporterów ABCB1 i ABCG2 oraz genu NF- κ B, także w terapii skojarzonej z taksolem lub oksaliplatyną. Wykazała przy tym, że wszystkie testowane związki obniżały poziom ekspresji badanych genów, a co ciekawsze, AD-013 okazał się być selektywnym inhibitorem transportera ABCB1. Aczkolwiek znacząca aktywność testowanych związków nie jest zasługą Doktorantki, to jednak zbadanie ich własności i wykazanie korzystnych parametrów przeciwnowotworowych jest wartością dodaną rozprawy.

Mam też kilka ogólnych uwag dotyczących uzyskanych wyników i ich znaczenia. Otóż, po pierwsze, bardzo skromnie potraktowana została analiza zależności aktywności od struktury związków, tzw. analiza SAR. W żadnej z prac nie znalazłam na ten temat dyskusji, co jest o tyle zaskakujące, że szczególnie w przypadku związków z grupy chinonów obecność różnych podstawników w pierścieniu pirolu lub furanu determinuje zróżnicowaną aktywność badanych związków. Taka informacja byłaby przydatna dla Chemików projektujących nowe związki do badań przeciwnowotworowych. Z drugiej strony, w omówieniu właściwie nie ma żadnej dyskusji na temat otrzymanych wyników w kontekście perspektywy dalszego rozwoju badanych związków jako potencjalnych leków, aczkolwiek w trzech z czterech prac oryginalnych znajdują się jednozdaniowe informacje o potencjalnych możliwościach dalszych badań w kontekście nowych leków na raka.

Pragnę podkreślić, że Pani mgr Angelika Długosz-Pokorska wykazała się zarówno umiejętnością planowania jak i wykonania zaawansowanych badań biologicznych, takich jak określanie poziomu ekspresji genów metodami ilościowego PCR w czasie rzeczywistym czy z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał (Western blot, ELISA), poznała technikę cytometrii przepływową i wykazała

się umiejętnością analizy zarówno cyklu komórkowego jak i metabolizmu komórki w procesie apoptozy. Oczywiście należy podkreślić, że świetnie dawała sobie radę z prowadzeniem hodowli komórkowych i testów opartych na analizie fluorescencyjnej i kolorymetrycznej. Wszystkie opisane doświadczenia miały wymaganą liczbę powtórzeń i spełniały wymagania analizy statystycznej. Doktorantka w sposób kompetentny wykazała także swoją wiedzę teoretyczną, zwłaszcza w zakresie mechanizmów i szlaków metabolicznych w komórkach rakowych, w szczególności w procesie indukcji apoptozy i odporności wielolekowej.

Poza wymaganą ustawowo oceną rozprawy z uznaniem odnotowałam, że Doktorantka jest współautorką łącznie 15 publikacji, w tym tylko jednej spoza listy JCR. Swoje wyniki prezentowała na 5 konferencjach i seminariach naukowych. Legitymuje się także udziałem w realizacji czterech projektów naukowych, w tym własnego projektu Preludium, finansowanego przez NCN, oraz projektu własnego dla młodych pracowników nauki. Jest to znakomity dorobek świadczący o dużym zaangażowaniu Doktorantki w prowadzone badania naukowe.

Podsumowując, Doktorantka wykazała się ogólną wiedzą w uprawianej dziedzinie nauki. Profesjonalnie przeprowadziła badania aktywności przeciwnowotworowej wybranej grupy związków. Udowodniła zdobycie wiedzy i doświadczenia w zakresie spójnego obszaru biologii molekularnej i komórkowej. Wykazała się umiejętnością prowadzenia badań naukowych i rozwiązaniem oryginalnego problemu naukowego.

Wniosek końcowy

Na podstawie powyżej omówionych osiągnięć stwierdzam, że przedstawiony do oceny materiał w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Z całym przekonaniem wnioskuję do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Angeliki Długosz-Pokorskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, w uznaniu ogromu pracy i zaangażowania, jakie Doktorantka włożyła w uzyskanie opisanych wyników, oraz znaczący dorobek naukowy wnioskuję o wyróżnienie ocenianej rozprawy.



Prof. dr hab. Barbara Nawrot

Łódź, 25 kwietnia 2019 r.