

Warszawa, 29.05.2023 r.

prof. dr hab. n. biol. Marcin Kruszewski
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa
e-mail: m.kruszewski@ichtj.waw.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Drogosz-Stachowicz

pt. „*Badanie właściwości przeciwnowotworowych i molekularnych mechanizmów działania pochodnych zawierających szkielet piranonu, chinolinonu i chinolinodionu*”

Nowotwory są jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się chorób cywilizacyjnych. Należąca do WHO Międzynarodowa Agencja ds. Badań nad Rakiem szacuje, że co piąty mężczyzna oraz co szósta kobieta na świecie zachorują na chorobę nowotworową w jakimś momencie swojego życia, a co ósmy mężczyzna i co jedenasta kobieta umrą z tego powodu. Według danych Krajowego Rejestru Nowotworów zachorowalność i umieralność na nowotwory gwałtownie wzrasta także w Polsce. Według szacunków przedstawionych przez Najwyższą Izbę Kontroli do 2025 r. nowotwory staną się główną przyczyną śmierci Polaków, wyprzedzając choroby serca.

Chociaż nowotwory mogą być leczone wieloma metodami, chemioterapia wydaje się być metodą najbardziej uniwersalną, a często, jak w przypadku nowotworów krwi czy nowotworów rozsianych, ma przewagę nad innymi metodami leczenia ze względu na systemowy sposób działania. Wadą chemioterapii jest silne działanie uboczne na zdrowe komórki, przede wszystkim te, które fizjologicznie szybko się dzielą, tj. szpik kostny, dlatego ciągle istnieje potrzeba poszukiwania nowych związków chemicznych, syntetycznych lub naturalnych, które posiadałyby silne działanie przeciwnowotworowe i pomijalne działanie na komórki zdrowe. Badania mgr Joanny Drogosz-Stachowicz bardzo dobrze wpisują się w te potrzeby i poświęcone są ocenie własności przeciwnowotworowych nowych pochodnych zsyntetyzowanych w Instytucie Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej.

Rozprawa doktorska mgr Drogosz-Stachowicz ma charakter badawczy i posiada układ edytorski typowy dla tego rodzaju monografii. Na rozprawę składa się: część teoretyczna (26 str.), opis założeń i celów pracy (2 str.), część doświadczalna podzielona na opis materiałów i

metodyki (15 str.) i opis uzyskanych wyników (48 str.), oraz dyskusja (15 str.). Pracę uzupełniają wnioski, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz wykorzystanej literatury oraz podsumowanie dorobku publikacyjnego Doktorantki. Piśmiennictwo stanowi łącznie 237 pozycji, z których większość została opublikowana w latach 2000-2022 co świadczy o aktualnym wymiarze naukowo-badawczym przeprowadzonych badań. Jedynie we wstępie i opisie materiałów i metod przywoływane są starsze prace, co jest całkowicie zrozumiałe ze względu na opisowy charakter tych rozdziałów. Dobór piśmiennictwa jest odpowiedni dla treści pracy. Do przeglądu piśmiennictwa z zakresu tematyki pracy oraz do dyskusji uzyskanych wyników badań własnych Doktorantka wykorzystwała publikacje opublikowane w języku angielskim. Jak to zwykle bywa przy takich spisach nie uchroniła się jednak przed pewnym nieładem i nieporządkiem, np. nie zawsze cytując pełne dane bibliograficzne (np. poz. 196, 215, 229) lub błędnie cytując rok wydania (poz. 215). Jednak błędów takich jest zaskakująco mało, biorąc pod uwagę liczbę pozycji bibliograficznych, i jak sądzę, wynikają z ułomności bazy danych oprogramowania do formatowania piśmiennictwa.

Wstęp rozprawy został podzielony na pięć części. Pierwsza stanowi wprowadzenie ogólne, druga opisuje częstość występowania nowotworów, a trzecia przyczyny ich powstawania. Dwie pozostałe części poświęcone są historii rozwoju terapii przeciwnowotworowej i opisowi właściwości biologicznych związków zawierających szkielety występujące w analogach będących przedmiotem rozprawy. Chociaż wstęp napisany jest interesująco, i czyta się go łatwo, nie wiem czy wszystkie jego części są potrzebne. Części opisujące częstość występowania nowotworów i ich etiologię wychodzą poza zagadnienia poruszane w pracy i bez wielkiej straty mogłyby być skrócone z włączone we wprowadzenie. Celem pracy było znalezienie związków hamujących rozwój nowotworów, a nie zapobiegających ich powstawaniu. Podobnie rys historyczny chemioterapii i opis poszczególnych klas związków przeciwnowotworowych, w moim odczuciu nie są potrzebne. Fajne w podręczniku dla studentów, w pracy doktorskiej są chyba zbyt mało szczegółowe i znów nie wiadomo w jaki sposób nawiązują do dalszej części pracy. Jeśli Doktorantka chciała pokazać swoją wiedzę na temat nowotworów, można było skoncentrować się na opisie nowotworów, których komórki wykorzystwała w swoich badaniach i chociażby wyjaśnić podstawowe różnice między komórkami MCF7, a potrójnie negatywnymi komórkami MDA-MB-231.

Niewątpliwie najciekawszą i najbardziej potrzebną jest część wstępu opisująca prekursorzy związków, których pochodne zostały zbadane w pracy doktorskiej. Część ta

wyraźnie pokazuje, że wybór pochodnych nie był „wzięty z sufitu”, czy jeśli ktoś woli angielski odpowiednik, nie były to „no hypothesis driven reseach”, ale był poprzedzony solidnym rozpoznaniem naukowym i ukierunkowany na określone procesy komórkowe. Właśnie opisu tych procesów zabrakło mi we wstępie doktoratu. Duża część pracy skupiona jest wokół procesu apoptozy i można było chociaż ogólnie napisać na czym ten proces polega. Wtedy stało by się jasne dlaczego Doktorantka stosowała określone metody, tj. TUNEL, oznaczała aktywność kaspaz czy fragmentację polimerazy poli(ADP-rybozy). Podobnie ważnym punktem pracy są procesy związane z aktywacją kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK). Tu też przydałby się krótki opis szlaku i jego roli w nowotworzeniu i progresji nowotworów. Zdaję sobie sprawę, że wiedza ta należy do kanonu wiedzy ogólnej biologa czy lekarza, ale należy założyć, że czytelnikami tej rozprawy doktorskiej mogą być także osoby bez odpowiedniej wiedzy, i dla nich przydałby się chociaż krótki opis poszczególnych procesów.

Pisząc wstęp Doktorantka nie uchroniła się przed skrótami myślowymi, trochę zaburzającymi aparat pojęciowy recenzenta. Dowiedziałem się, że *„Modyfikacje epigenetyczne obejmują metylację DNA, modyfikacje kowalencyjne histonów, struktury chromatyny oraz niekodujących RNA (mi-RNA), a także ich wzajemne relacje.”* Proszę o wyjaśnienie, co Autorka miała na myśli pisząc o modyfikacjach kowalencyjnych struktury chromatyny, i czy Autorce na pewno chodziło o kowalencyjne modyfikacje miRNA, np. adenylację, czy o miRNA jako takie.

Cel pracy został sformułowany jednoznacznie z wymienieniem celów szczegółowych. Zarówno cel główny, jak i cele szczegółowe dobrze odpowiadają zawartości pracy.

Analiza treści części pracy opisującej materiały i metodykę badań pozwoliła na weryfikację przydatności przyjętych metod badawczych do założonych celów pracy. Opis użytych materiałów i metod jest bardzo szczegółowy. Metody są w pełni wystarczające do realizacji założonych celów pracy i otrzymania opisanych wyników. Cieszy, że Doktorantka nie tylko używa metod, ale także rozumie zasadę ich działania, o czym świadczy chociażby określenie testu MTT jako testu „do pomiaru aktywności metabolicznej komórek”. W literaturze, zarówno polsko- jak i anglojęzycznej, pokutuje utrwalone przekonanie, że test MTT oznacza przeżywalność komórek, kiedy w rzeczywistości oznacza zdolność badanego układu do redukcji soli tetrazolowej. W szczególnych przypadkach, redukcja taka zachodzi nawet w układach bezkomórkowych, co znacznie zaburza interpretację wyników.

Nie mam zastrzeżeń co do metod użytych w pracy, są wiarygodne i dobrze odpowiadają założonym celom pracy. Jedyne moje zastrzeżenie budzi oznaczanie produkcji

reaktywnych form tlenu (RFT). Doktorantka inkubowała komórki z badanymi związkami przez 24 godz., a następnie dodawała odczynnik wskaźnikowego CellROX Green. Dwadzieścia cztery godziny to stosunkowo długi czas, wystarczający na wytworzenie odpowiedzi komórki na czynnik generujący RFT, tj. synteza glutationu, czy enzymów antyoksydacyjnych. W mojej ocenie korzystniejszy byłby krótszy czas inkubacji, np. 2-4 godz., a poziom RFT po 24 godz. traktowania odzwierciedla raczej homeostazę redoks komórek w warunkach narażenia na czynniki toksyczne. Opisane metody statystyczne są proste, ale w mojej ocenie wystarczające do wysnucia wniosków końcowych. Jedynie w kilku przypadkach wyznaczanie błędu standardowego średniej (SEM) dla doświadczeń w dwóch powtórzeniach wydaje mi się nieco karkołomne.

Badania wykonane zostały na 5 liniach komórkowych, trzech nowotworowych i dwóch normalnych. Cieszy, że Doktorantka zdaje sobie sprawę z konieczności porównania działania nowych związków na liniach nowotworowych i liniach normalnych, jednak o ile linia MCF-10A jest dobrą linią odniesienia dla linii MCF-7 i MDA-MB-23, to porównywanie działania związków na promieloblastyczną linię HL-60 do ich działania na keratynocyty linii HACAT budzi pewne zastrzeżenia. Keratynocyty są z reguły bardziej odporne na działanie różnych czynników niż białaczki, i używanie ich jako linii odniesienia może prowadzić do błędnych wniosków. W przyszłych badaniach radziłbym użyć nienowotworowych linii komórek krwi, tj. WIL2-S, czy ich pochodna TK6 lub linia RPMI 1788.

Cześć wynikowa pracy podzielona się na trzy niezależne wątki, stosownie do badanych grup związków. W części pierwszej opisane są wyniki doświadczeń z użyciem pochodnych 3-metylidenochinolin-4-onu (13 pochodnych), w drugiej pochodnych 3-metylidenotetrahydro-piran-4-onu (15 pochodnych), a w części trzeciej pochodnych 3-dietoksyfosforylofurochinolino-4,9-dionu (18 pochodnych).

Aktywność przeciwnowotworowa poszczególnych grup pochodnych badana była różnymi metodami, jak się wydaje dobranymi pod kątem spodziewanych mechanizmów działania. Część wspólną metod stanowiło badanie aktywności metabolicznej testem MTT, wpływu badanych związków na proliferację komórek, cykl komórkowy i apoptozę metodą cytometrii przepływowej i zestawem Apoptosis, DNA Damage and Cell Proliferation Kit. Najbardziej obiecujące pochodne były dodatkowo badane innymi metodami.

Z pochodnych 3-metylidenochinolin-4-onu największą aktywność przeciwnowotworową wykazywał 2-etylo-3-metylideno-1-tosylo-2,3-dihydrochinolino-4-(1H)-on (analog 2), i ten związek został wybrany do dalszych badań na linii komórkowej HL60. Analog 2 wykazywał silne działanie proapoptotyczne, i powodował śmierć komórek HL-60 w fazie S

cyklu komórkowego. Dalsze badania wykazały, że związek ten indukował powstawanie podwójnoniciowych pęknięć nici DNA, a apoptoza indukowana jest zarówno szlakiem zewnątrzkomórkowym, jak i szlakiem mitochondrialnym. Badając wątek indukcji apoptozy przez szlak mitochondrialny Doktorantka stwierdziła, że 1 μ M stężenie analogu 2 dodane do komórek powoduje spadek potencjału błon mitochondrialnych, jednak, co ciekawe, nie obserwowała jednoczesnej nadprodukcji RFT. Analog 2 powodował także zmniejszenie ekspresji kinaz aktywowanych mitogenami i ich ufosforylowania. Ponieważ ekspresja badana była na poziomie mRNA, a ufosforylowanie na poziomie białka, ciekaw jestem, czy spadek ufosforylowania spowodowany jest rzeczywiście przez zmniejszenie fosforylacji białka, czy też przez zmniejszenie ilości białka, przy zachowaniu tego samego poziomu fosforylacji. Poza tym, na Ryc. 27c brak jest oznaczenia istotności statystycznej, trudno jest więc wnioskować, czy opisane zmiany w ufosforylowaniu są istotne statystycznie.

Kolejną badaną grupą były pochodne 3-metylidenotetrahydropiran-4-onu, Tu największą aktywność/selektywność przeciwnowotworową wykazywały dwa związki trans-2,6-diizopropyl-3-metylidenotetrahydropiran-4-on (pochodna 17, najbardziej selektywna) i trans-6-fenyl-2-izopropyl-3-metylidenotetrahydropiran-4-on (pochodna 20, najbardziej cytotoksyczna). Obie pochodne były wyraźnie mniej toksyczne niż poprzednio badane pochodne 3-metylidenochinolin-4-onu. Wydaje się, że odmienny był też mechanizm ich działania. Uzyskane wyniki wskazują, że obie pochodne mogą hamować aktywność topoizomerazy II α , chociaż zostało to udowodnione doświadczalnie tylko dla pochodnej 20. Zastanawiam się, czy w opisie rysunku nr 36 nie nastąpiła pomyłka, ponieważ wcześniejsze wyniki (indukcja podwójnoniciowych pęknięć DNA i blok w fazie G2/M) wskazują, że to pochodna 17 powinna silniej oddziaływać na topoizomerazę II α . Ponadto niższe stężenie pochodnej 20 silniej hamuje topoizomerazę II α bardziej niż stężenie wyższe.

Trzecią grupą zbadanych związków były pochodne 3-dietoksyfosforylofurochinolino-4,9-dionu. Związki te wykazywały działanie przeciwnowotworowe większe niż badane wcześniej pochodne 3-metylidenochinolin-4-onu i dwa z nich zostały wytypowane do dalszych badań (związek 29c i 29i). Oba związki powodowały zahamowanie komórek w fazie S cyklu, z jednoczesnym zwiększeniem odsetka fazy subG0/G1. Jednocześnie obserwowano wyraźną apoptozę połączoną z indukcją powstawania podwójnoniciowych pęknięć DNA, spadkiem potencjału błony mitochondrialnej, indukcją powstawania RFT oraz

zahamowaniem aktywności białka NQO1. Wyniki otrzymane dla tych pochodnych są bardzo spójne i wyraźnie sugerują udział nadprodukcji RFT w toksyczności obu pochodnych.

Pochodną 29i Doktorantka wybrała do dalszych badań. Działanie pochodnej 29i zbadano dodatkowo na potrójnie negatywnej linii nowotworu piersi MDA-MB-231. Toksyczność (test MTT) badanej pochodnej była podobna dla obu linii komórkowych. Jest to o tyle ciekawe, że wszystkie pozostałe testy, np. wbudowywanie BRDU, wpływ na cykl komórkowy, indukcja apoptozy, rozczepienie PARP czy ogniska histonu γ H2AX wyraźnie wskazują na większą toksyczność pochodnej 29i w stosunku do komórek MCF-7. Badania pochodnej 29i zwieńczone zostały badaniami *in vivo*, w których określono ostrą toksyczność pochodnej i jej wpływ na wzrost guza w syngenicznym modelu myszy C3H. Pochodna nie była toksyczna i hamowała wzrost guza. Ponieważ Doktorantka wszczepiała myszom guzy wyindukowane w 6-ciu innych myszach, i obserwowała dużą różnorodność w szybkości wzrostu guza, nasuwa się pytanie, czy była jakoś kontrolowana waga wszczepianego materiału. Czy były jakieś różnice w szybkości wzrostu guza u myszy, które dostały równowagowe fragmenty guzów lub fragmenty tego samego guza?

Dyskusja jest ciekawa i rozwiewa częściowo moje wątpliwości dotyczące wstępu, ponieważ dosyć szczegółowo opisuje wybrane mechanizmy działania ksenobiotyków. Tak jak już napisałem wcześniej, te fragmenty z powodzeniem mogłyby się znaleźć we wstępie, a w dyskusji można było skupić się na trochę głębszym omówieniu obserwowanych zjawisk. Na przykład, Doktorantka stwierdziła wzrost ekspresji receptora FAS po działaniu chinolinonu 2. Receptor FAS, do aktywacji potrzebuje liganda (w warunkach fizjologicznych jest to białko FASL (FAS ligand) występujące na błonach cytotoksycznych limfocytów T i komórkach NK. Pozostaje kwestią do wyjaśnienia, czy już sam wzrost ekspresji FAS wystarczy do aktywacji szlaku, czy chinolinon 2 może sam aktywować FAS lub któreś z białek kompleksu DISC, bez udziału fizjologicznego aktywatora. Może są jakieś dane literaturowe na ten temat.

Wyniki otrzymane dla dwóch pozostałych grup badanych związków są bardziej spójne i ich dyskusja w moim odczuciu budzi mniej kontrowersji. Należałoby się jedynie zastanowić nad przyczyną zahamowania komórek w fazie S cyklu po działaniu pochodnych 29c i 29i. Powstawanie uszkodzeń DNA powoduje zahamowanie w fazie G2/M, jak to doskonale widać w przypadku badanych analogów metyлідenotetrahydropiranonów. Zahamowanie w fazie S może świadczyć o trudnościach w syntezie DNA.

Nie mogę zgodzić się z niektórymi tezami postawionymi przez Doktorantkę. Omawiając chinolinon 2 Doktorantka stwierdziła *„Zatrzymanie cyklu komórkowego jest jednym z mechanizmów, za pomocą którego leki przeciwnowotworowe mogą wywierać swoje*

działanie”. W moim odczuciu zatrzymanie cyklu komórkowego jest raczej efektem działania ksenobiotyków, niż mechanizmem ich toksyczności. Jak Doktorantka sama stwierdza w kolejnym zdaniu, zatrzymanie w cyklu wynika z powstawania, np. uszkodzeń DNA, i aktywacji odpowiednich szlaków sygnalizacyjnych. Podsumowując działanie chinolinonu 2 Doktorantka napisała „... uzyskane wyniki wskazują, że chinolinon 2 indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie subG0/G1.” Nie ma czegoś takiego jak zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie subG1/G0. Faza subG1/G0 jest tylko z nazwy „fazą cyklu komórkowego”, ponieważ są to fragmenty komórek zawierające mniej DNA niż komórki w fazie G1/G0 powstające w wyniku fragmentacji DNA i rozpadu komórek. Fazę subG1/G0 wyróżniamy badając rozkład komórek w cyklu komórkowym, może się ona zwiększać lub zmniejszać, ale komórki nie mogą się w niej zatrzymać, ponieważ fazą cyklu jest tylko umownie.

Wnioski są właściwie podsumowaniem pracy i skróconym opisem wyników. Spodziewałbym się raczej przemyśleń Doktorantki na temat mechanizmów działania poszczególnych grup związków i ewentualnej antycypacji co do ich przyszłych losów. Leki przeciwnowotworowe warto rozwijać, jeśli ich działanie przeciwnowotworowe jest silniejsze niż związków już funkcjonujących w leczeniu lub jeśli większe jest ich działanie oszczędzające dla komórek zdrowych przy zachowaniu podobnego działania przeciwnowotworowego. Czy któryś z badanych przez Doktorantkę związków spełnia te warunki?

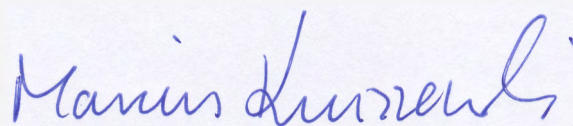
Przedstawiając powyższe uwagi moim zamiarem jest raczej dyskusja z Doktorantką niż krytyka jej badań. Nie mam zastrzeżeń co do strony merytorycznej pracy. Dobór metod i wykonanie doświadczeń są odpowiednie i świadczą o dobrym warsztacie naukowym Doktorantki. Doktorantka przebadła 46 pochodnych, praca godna Herkulesa, i uzyskała interesujące i unikatowe wyniki. Część przebadanych związków jest perspektywiczna i warta dalszego rozwijania. Opisanie niedociągnięcia są łatwe do poprawienia czy też uzupełnienia.

Z edytorskiego obowiązku mogę stwierdzić, że praca napisana jest dobrze. Doktorantka nie uniknęła kilku potocznych, czy też niezręcznych sformułowań stylistycznych i literówek, ale jest ich stosunkowo mało. Trochę mi zgrzyta zaczynanie tytułów podrozdziałów od słowa „Badanie”, proszę w przyszłości unikać takich sformułowań, bo kładą nacisk na samą czynność badania, a nie na przedmiot badań.

Powyższe uwagi mają raczej charakter pomocniczy oraz redakcyjny, i nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej mgr Joanny Drogosz-Stachowicz. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego opisanego w celach pracy, i zarówno zawartość merytoryczna rozprawy, jak i sposób przedstawienia wyników, świadczą o samodzielności i dojrzałości naukowej mgr Joanny Drogosz-Stachowicz i w pełni uzasadniają

ubieganie się o stopień doktora. W mojej ocenie rozprawa spełnia wymogi ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. z 2003 r. nr 65 poz. 595 z późn. zm.). Tym samym z pełnym przekonaniem wnioskuję do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie **mgr Joanny Drogosz-Stachowicz** do dalszych etapów postępowania związanego z nadaniem stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie biorąc pod uwagę ogrom wykonanej pracy, właściwy dobór metod, poprawność interpretacji wyników i dyskusji wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie tej pracy.



Marcin Kruszewski