



Białystok, 21.07.2016

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

p.t.: „Ocena molekularnego mechanizmu działania nowych pochodnych tetrahydroakrydyny i cyklopentachinoliny jako potencjalnych związków przeciwnowotworowych” wykonanej przez mgr Paulinę Olszewską w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji Katedry Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Rak płuc należy do najczęściej występujących nowotworów w na świecie i w Polsce. Około 60 % pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem płuc umiera w ciągu roku od rozpoznania choroby, a 5-letni wskaźnik przeżycie wynosi zaledwie 15 %. Mimo znaczącego postępu farmakoterapii leki stosowane w terapii tych nowotworów charakteryzują się ograniczoną selektywnością, co powoduje poważne działania niepożądane. Wysoka śmiertelność z powodu nowotworów płuc oraz ograniczone skuteczność i bezpieczeństwo farmakoterapii wskazują na potrzebę poszukiwania nowych efektywnych leków przeciwnowotworowych.

Podjęcie przez mgr Paulinę Olszewską badań nad nowymi pochodnymi tetrahydroakrydyny i cyklopentachinoliny jako potencjalnych substancji o działaniu przeciwnowotworowym wpisuje się w nurt nowoczesnych kierunków współczesnej chemii leków. Pochodne akrydyny są ważną grupę związków przeciwnowotworowych, o działaniu polegającym na interkalacji do DNA. Ponadto, aktywność przeciwnowotworowa tej grupy leków wynika też z hamowania aktywności kluczowych enzymów regulujących proliferację komórek: topoisomeras DNA, polimeraz i telomeras. Ta grupa związków jest także



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Samodzielna Pracownia Analizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

intensywnie badana pod kątem zastosowania jako substancji przeciwpierwotniakowych, przeciwbakteryjnych i przeciwwirusowych. Dotychczas otrzymano liczne pochodne akrydyny, jednakże nadal poszukuje się związków bardziej aktywnych i selektywnie działających na komórki nowotworowe. Z tego względu wykonane przez Doktorantkę badania nad aktywnością cytotoksyczną nowych pochodnych tetrahydroakrydyny i cyklopentachinoliny uważam za uzasadnione i przydatne zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia.

Celem przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej było zbadanie aktywności przeciwnowotworowej 32 nowych pochodnych akrydyny oraz określenie molekularnego mechanizmu działania związków najsilniej hamujących wzrost komórek raka płuc. Mgr Paulina Olszewska zbadła 16 pochodnych tetrahydroakrydyny i 16 pochodnych cyklopentachinoliny połączonych z ugrupowaniami kwasu 6-hydrazynonikotynowego lub 4-fluorobenzoesowego, różniącymi się liczbą atomów węgla w łańcuchu alifatycznym. W wyniku oceny metodą WST-1 wpływu tych pochodnych na zahamowanie wzrostu komórek raka płuc, Doktorantka wykazała, że zarówno pochodne tetrahydroakrydyny jak i cyklopentachinoliny połączone z resztą kwasu 4-fluorobenzoesowego hamowały silniej wzrost komórek raka płuc niż pochodne z resztą kwasu 6-hydrazynonikotynowego. Ponadto, aktywność cytotoksyczna związków z resztą kwasu 4-fluorobenzoesowego korelowała ze wzrostem liczby atomów węgla w łańcuchu alifatycznym. W oparciu o wyliczone parametry IC50 z każdej grupy badanych pochodnych do dalszych badań wybrała po 6 związków najsilniej hamujących wzrost komórek raka płuc.

Dalsze badania dotyczyły wyjaśnienia mechanizmu działania wybranych związków. Analiza wpływu 6 wybranych pochodnych akrydyny na progresję cyklu komórkowego i proces apoptozy wykazała, że związki z resztą kwasu 4-fluorobenzoesowego hamowały wzrost komórek raka płuc zarówno w wyniku inhibicji cyklu komórkowego w fazie G0/1 oraz indukcji apoptozy zależnej od kaspaz 3/7. Pochodne z resztą kwasu 6-hydrazynonikotynowego powodowały śmierć komórek raka płuc w wyniku apoptozy, natomiast nie miały istotnego wpływu na hamowanie cyklu komórkowego. Z tego względu



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Samodzielna Pracownia Analizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

do dalszych oznaczeń określających molekularny mechanizm działania Doktorantka wybrała 4 związki połączone z resztą kwasu 4-fluorobenzoowego. Stwierdziła, że badane związki indukowały szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA poprzez autofosforylację kinazy ATM, która powodowała wczesną fosforylację histonu H2A.X oraz aktywację białka p53. Badania nad molekularnymi mechanizmami indukcji apoptozy wykazały ponadto, że badane związki powodowały obniżenie potencjału błony mitochondrialnej oraz zwiększenie ekspresji proapoptotycznego białka Bax i obniżenie ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2, wskazując na indukcję apoptozy poprzez aktywację szlaku mitochondrialnego. Magister Paulina Olszewska wykazała także, że pochodne cyklopentachinoliny z resztą kwasu 4-fluorobenzoowego hamowały cykl komórkowy w fazie G0/1 poprzez wzrost ekspresji inhibitora kinazy cyklozależnej 2 (CDK2), białka p21, natomiast pochodne tetrahydroakrydyny nie wpływały na ekspresję tego białka. Pochodne z resztą kwasu 4-fluorobenzoowego powodowały obniżenie aktywności CDK2, co w konsekwencji przyczyniało się do zahamowania przejścia komórek z fazy G1 do fazy S. Związki te znacząco hamowały migrację komórek raka płuc. Doktorantka wyselekcjonowała 2 pochodne tetrahydroakrydyny i cyklopentachinoliny z resztą kwasu 4-fluorobenzoowego zawierające 9 atomów węgla w łańcuchu alifatycznym jako związki, które najskuteczniej hamowały wzrost komórek raka płuc w wyniku zahamowania cyklu komórkowego oraz indukcji apoptozy. Ponadto, wyniki przedstawione w Jej rozprawie doktorskiej wykazały, że reszta kwasu 4-fluorobenzoowego i długość łańcucha alifatycznego nasilają właściwości przeciwnowotworowe pochodnych tetrahydroakrydyny i cyklopentachinoliny oraz warunkują mechanizm ich działania.

Podjęte przez Doktorantkę badania, jasne sformułowanie ich celu, zakresu i sposobu przeprowadzenia doświadczeń uważam za przemyślane i zasadne. Doświadczalna część pracy poprzedzona została wstępem, w którym Autorka opisuje zagadnienia związane z częścią eksperymentalną. Wiele miejsca poświęciła wprowadzeniu czytelnika w charakterystykę pochodnych akrydyny i ich zastosowaniu w farmakoterapii. Część rozprawy dotycząca metodyki badań zwraca uwagę starannością i szczegółowym opisem.



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Samodzielna Pracownia Analizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

Zastosowane metody badawcze obejmują nowoczesne techniki i są odpowiednio dobrane do realizacji zaplanowanego celu badań. Wyniki oznaczeń zostały poddane analizie statystycznej przy użyciu testu t-Studenta. Literatura omawianych zagadnień została starannie dobrana tematycznie i w przeważającej części obejmuje prace opublikowane w ciągu ostatnich dziesięciu lat.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska ma ogólnie przyjęty układ. Liczy 135 stron maszynopisu. Obejmuje dziewięć rozdziałów: część teoretyczna, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, omówienie wyników i dyskusja, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo oraz załączniki. Wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań przedstawione zostały w postaci 38 rycin i 2 tabel. Stanowią one staranną lustrację bardzo obszernej pracy wykonanej przez Doktorantkę. Na podstawie przeprowadzonych badań, Autorka sformułowała 10 wniosków zobrazowanych schematem, ułatwiającym zrozumienie złożonego mechanizmu działania badanych pochodnych akrydyny. Na podkreślenie zasługuje bardzo starannie przygotowana szata graficzna i dopracowana strona edytorska pracy.

Potwierdzeniem wysokiej wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej jest opublikowanie wyników badań w postaci 2 prac oryginalnych w czasopismach z listy filadelfijskiej (European Journal of Pharmacology – IF 2,532 oraz Biomedicine and Pharmacotherapy – IF 2,023), w których Doktorantka jest pierwszym autorem.

Lektura rozprawy nasuwa kilka uwag:

1. Niektóre użyte sformułowania np. „medium” (str. 48) są zapożyczeniami z języka angielskiego.
2. Określenia „komórki zdrowe” (str. 53), „aktywność przeciwnowotworową” (str. 62) w aspekcie oceny morfologii komórek są nieuzasadnione. W punkcie 4.5. Autorka ocenia migrację komórek, natomiast w opisie oznaczenia stosuje zamiennie z „migracją komórek” określenia „zarastanie rany”, „zmniejszanie powierzchni rany”, co jest niepoprawne.



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Samodzielna Pracownia Analizy Leków
15-222 Białystok, ul. Adama Mickiewicza 2d
Tel: (85)7485735

3. Punkt 1 Wniosków dotyczy analizy właściwości cytotoksycznych a nie właściwości przeciwnowotworowych badanych pochodnych.
4. Tytuł panelu trzeciego rozdziału Wnioski: „Wpływ 4 wyselekcjonowanych związków na mechanizm działania” jest nietrafny dotyczy bowiem opisu proponowanego mechanizmu działania badanych związków.

Podsumowując chciałbym podkreślić, że powyższe uwagi dotyczą głównie zagadnień interpretacyjnych i nie obniżają wartości merytorycznej wykonanej pracy.

Rozprawę doktorską mgr Pauliny Olszewskiej oceniam bardzo pozytywnie. Uważam, że zrealizowała ona założone cele badawcze, a przedstawiona mi do oceny praca odpowiada warunkom stawianym na stopień doktora nauk farmaceutycznych. W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie magister Pauliny Olszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na powyższe wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Olszewskiej.

Dr hab. n. farm. Wojciech Miltyk