



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

Wydział Farmaceutyczny

Zakład Chemii Leków

15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2D

Tel. (85) 748-57-06, FAX (85) 748-58-66

arkadiusz.surazynski@umb.edu.pl

Dr hab. n. farm. Arkadiusz Surazyński

Białystok, 29.08.2019.

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

Pt.: "Ocena komponentu przeciwnowotworowego akrydyny w układach zawierających kwas jodobenzoesowy" wykonanej przez mgr Małgorzatę Girek w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Przedmiotem badań stanowiących treść niniejszej pracy doktorskiej była ocena komponentu przeciwnowotworowego w nowych pochodnych tetrahydroakrydyny zawierających kwas jodobenzoesowy oraz zbadanie ich cytotoksyczności, mechanizmu działania przeciwnowotworowego i właściwości antyoksydacyjnych na komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc i raka jelita grubego.

Podjęcie tego zagadnienia jest szczególnie ważne i zasadne gdyż zarówno rak płuc jak i jelita grubego są chorobami o złych rokowaniach i znajdują się w ścisłej czołówce nowotworów pod względem zarówno zapadalności jak i śmiertelności. Współczesna wiedza na temat przyczyn powstawania tych nowotworów oraz samej biologii komórki jest nadal słabo poznana co przyczynia się do problemów diagnostycznych jak i terapeutycznych. Obecnie skuteczność terapii przeciwnowotworowej w dużej mierze zależy do stadium choroby, w którym podejmuje się leczenie omawianych nowotworów. Zazwyczaj stanowi ono leczenie chirurgiczne, radioterapię a następnie chemioterapię, która niestety nadal wykazuje niewystarczającą skuteczność. W nowoczesnej chemioterapii, stosowane związki powinny charakteryzować się ukierunkowaną molekularnie terapią celowaną, wywołującą selektywną indukcją apoptozy w komórkach nowotworowych, jednocześnie będąc bezpieczną dla komórek prawidłowych oraz charakteryzującą się korzystnym profilem farmakokinetycznym.

Obiecującym kierunkiem terapii wykorzystującym indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych jest zastosowanie pochodnych akrydyny. W Katedrze Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi zsyntetyzowano po raz pierwszy nowe

pochodne tetrahydroakrydiny (1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoakrydiny). Syntezy tych związków zostały opisane przez dr hab. Roberta Skibińskiego w renomowanym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym „Chemical Biology & Drug Design”. Następnie na podstawie przeprowadzonych wcześniej przez prof. dr hab. n. farm. Pawła Szymańskiego badań biodystrybucji innych grup pochodnych cyklopentachinoliny, które również zostały opublikowane w wysoko punktowanym czasopiśmie „International Journal of Molecular Sciences”, wykazano, że związki te gromadzą się głównie w płucach i jelitach szczurów, posiadając duże powinowactwo do tych tkanek. Obiecujące wyniki badań stały się podstawą do kontynuowania prac nad grupami pochodnych tetrahydroakrydiny w zakresie ich działania cytotoksycznego na komórki nowotworów płuc i jelit.

Podjęcie przez Doktorantkę niniejszego tematu badawczego uważam za ważne z punktu widzenia metodologicznego, a także potencjalnie terapeutycznego. Doktorantka wykorzystwała doświadczenie własne oraz znakomitego zespołu badawczego, w którym pracowała, którego potencjał poznawczy i publikacyjny jest na poziomie światowym, co stanowi gwarancję doboru prawidłowej metodologii badań, wiarygodności uzyskanych wyników oraz prawidłowości wyciągniętych wniosków. Wykorzystała również aktualną wiedzę z zakresu biologii molekularnej, biologii nowotworów szczególnie w aspekcie apoptozy. Świadczy o tym bogata literatura dotycząca tych zagadnień, zamieszczona w piśmiennictwie rozprawy doktorskiej, na podstawie której Doktorantka opracowała syntetyczny wstęp, w którym wprowadza czytelnika w temat podjętej rozprawy. Zawiera on informację o omawianych zagadnieniach, które zostały poparte aktualnym i poprawnie dobranym piśmiennictwem.

We wstępie Doktorantka przedstawia epidemiologię, patogenezę oraz terapię zarówno nowotworów płuc jak i jelita grubego. Opisuując metody leczenia nowotworów, sporo miejsca poświęcając chemioterapii, która niestety nie przynosi zadowalających efektów i ciągle wymaga poszukiwania nowych rozwiązań. Jedną z zaproponowanych przez Autorkę substancji o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym są pochodne akrydiny. Opisuje dotychczasową wiedzę na temat wykorzystania tych substancji w terapii nowotworów oraz wyjaśnia udział i molekularny mechanizm działania pochodnych akrydiny w tym obszarze. Przybliży czytelnikowi wiedzę na temat cyklu komórkowego oraz apoptozy, opisując ich molekularny przebieg skupiając się na rodzinach białek zaangażowanych w te procesy. Mając również na względzie badanie nowych pochodnych, Autorka opisuje niezbędne parametry ADMET jakie musi spełniać substancja aktywna aby mogła zostać wykorzystana w terapii.

Doktorantka podjęła badania, których celem była ocena komponentu przeciwnowotworowego jakim jest podstawnik jodobenzoesowy w dziewięciu nowych pochodnych tetrahydroakrydyny na komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc i jelita grubego, poprzez zbadanie ich cytotoksyczności, mechanizmu działania przeciwnowotworowego oraz właściwości przeciwzapalnych i antyoksydacyjnych.

W swoich badaniach wykazała, iż prawie wszystkie związki mają dobre profile farmakokinetyczne i potencjalnie dobrą biodostępność po podaniu doustnym. Jednakże w związkach 1e-1i należy rozważyć dożylną drogę podania badanych substancji.

Wszystkie związki wykazywały wysoką aktywność cytotoksyczną w stosunku do badanych linii komórek nowotworowych i były bardziej toksyczne niż związki referencyjne, klasyczne chemioterapeutyki stosowane obecnie w terapii tych nowotworów. Zjawisko to dotyczy szczególnie linii komórkowej A549 (niedrobnokomórkowego rak płuc), dla której wartości IC50 były wyższe niż dla komórek HT-29, co wskazuje, że komórki gruczolakoraka jelita grubego były bardziej wrażliwe na pochodne tetrahydroakrydyny niż komórki niedrobnokomórkowego raka płuc. Autorka wskazała wyraźną zależność działania od budowy. Wykazała, że pozycja jodu w pozycji *para* i dłuższy łańcuch alifatyczny (3-4 atomy węgla) posiada najsilniejszy efekt cytotoksyczny. Ponadto, grupa związków z jodem w pozycji *para* miała silniejsze działanie cytotoksyczne niż związki z grup *orto* i *meta*. Spośród wszystkich badanych pochodnych, związek **1i** (jod w pozycji *para* i 4 atomy węgla w łańcuchu alifatycznym) był najbardziej toksyczny w stosunku do obu linii komórkowych, bardziej niż leki referencyjne stosowane w konwencjonalnej terapii.

Badane przez Autorkę związki wykazywały również działanie przeciwzapalne, jednakże nie na tyle znaczące aby miało to znaczenie terapeutyczne.

Z badań Doktorantki wynika, iż mechanizm działania wyselekcjonowanych związków (1b, 1e, 1i – najbardziej cytotoksycznych wobec linii A549 i 1c, 1e, 1i – najbardziej cytotoksycznych wobec linii HT-29) polegał na hamowaniu cyklu komórkowego w fazie G0/G1 oraz silnie indukowały proces apoptozy. Badane substancje wywoływały wczesną apoptozę w komórkach HT-29, a proces późnej apoptozy w komórkach A549. Molekularny mechanizm tych procesów był związany z aktywacją kaspaz czego dowodem jest aktywacja białka PARP-1. Dodatkowymi elementami wspomagającymi aktywację procesu apoptozy było uszkodzenie DNA na drodze indukcji DSB, obserwowane jako fosforylacja histonu H2AX oraz indukcja stresu oksydacyjnego.

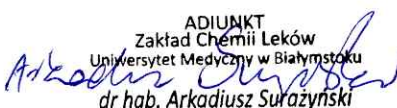
Bardzo cenny jest fakt, iż Doktorantka na podstawie wyników badań wyselekcjonowała najbardziej obiecujących związki o potencjalnym znaczeniu w farmakoterapii i tak:

3. PARP jest substratem kaspaz, ale jest to jedna z dróg jego degradacji – dlatego też w celu ustalenia szlaku aktywacji apoptozy stosowniej byłoby zbadać ekspresję kaspaz 9, 8 oraz 3.
4. Podobnie, hamowanie aktywności hialuronidazy również nie jest specyficznym markerem działania przeciwzapalnego. Stosowniej byłoby sprawdzić ekspresję np. COX-2 lub NFκB.
5. Wiodącą metodą badania cytotoksyczności w pracy wydaje się być test MTT, jednakże Autorka wykonała szereg badań z wykorzystaniem cystometrii przepływowej, która daje zdecydowanie bardziej precyzyjne wyniki oraz większe możliwości.
6. We wnioskach przy poszczególnych związkach sugestie, iż mogą one stać się lekami są trochę na wyrost. Od badań podstawowych do wdrożenia substancji jako leku wymaga się licznych badań farmakologicznych, toksykologicznych i 4 faz badań klinicznych.
7. Wstęp pracy został napisany poprawnie aczkolwiek chaotycznie i ze sporą ilością drobnych błędów zarówno językowych, stylistycznych jak i merytorycznych. Należy pamiętać iż IC50 i EC50 nie zawsze są tożsame i mają jednakowe wartości, natomiast znaczenie kliniczne, a nie jak pisze Autorka zastosowanie kliniczne, mają leki których stopień wiązania z białkami krwi jest większy niż 80% - chociażby ze względu na potencjalne interakcje.

Powyższe pytania nie mają charakteru uwag krytycznych, mogą natomiast stanowić inspirację do doskonalenia warsztatu badawczego oraz dyskusji nad potencjalnym wykorzystaniem wyników badań w eksperymentalnej terapii chorób nowotworowych.

Reasumując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Girek jest pracą wartościową, poprawnie przygotowaną warsztatowo i wnosi elementy poznawcze w zakresie wiedzy o właściwościach przeciwnowotworowych nowych pochodnych tetrahydroakrydyny zawierających kwas jodobenzoowy.

Upoważnia mnie to do wystąpienia z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Małgorzaty Girek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

ADIUNKT
Zakład Chemii Leków
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

dr hab. Arkadiusz Surazyński