

Łódź, 20 lutego 2015 r.

## OCENA

*pracy doktorskiej Karoliny Królewskiej pt. „Poziom i mechanizm  
cytotoksyczności związków z grupy benzo[b]furanów  
i dikarboksyimidów w wybranych liniach komórek nowotworowych”*

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Królewskiej dotyczy bardzo istotnego zagadnienia jakim jest zaprojektowanie i synteza nowych związków o aktywności przeciwnowotworowej, które działają wybiórczo na komórki nowotworowe, a są nietoksyczne dla komórek prawidłowych. Jest to zadanie niezwykle trudne i bardzo aktualne o czym świadczy lawinowy wzrost liczby ośrodków naukowych na świecie, zajmujących się poszukiwaniem takich związków i wykonujących szeroko zakrojone badania przesiewowe licznych substancji pochodzenia naturalnego i syntetycznego w tym kierunku. O skali problemu świadczy również ogromna liczba opublikowanych na ten temat prac naukowych, popularno-naukowych i innych opracowań. Wpisanie haseł anticancer compounds from plants, from microbes, from marine organisms i from actinomycetes w przeglądarkę internetową google pokazuje odpowiednio 223 tys., 467 tys., 115 tys. i 112 tys. wyników. Problem ten wynika głównie z tego, że współczesna onkologia kliniczna wciąż nie dysponuje w pełni skuteczną chemioterapią przeciwnowotworową, a leczenie za pomocą ogólnie dostępnych terapeutyków pozwalają osiągnąć w miarę zadawalające wyniki jedynie w przypadku rzadkich i bardzo rzadkich nowotworów. Większość powszechnie występujących nowotworów jest stosunkowo oporna na leczenie i jedynie niewielki procent pacjentów wykazuje względnie dobrą odpowiedź na konwencjonalną terapię. Największe problemy stwarzają oporność wielolekowa, rozwijana przez znaczną liczbę pacjentów nawet po podaniu pierwszej dawki leku, niska selektywność i specyficzność chemioterapeutyków w stosunku do komórek poszczególnych typów nowotworu oraz duża toksyczność ogólnoustrojowa, wynikająca z ich cytotoksycznego działania na tkanki prawidłowe. W świetle postępującego wzrostu zachorowalności na choroby nowotworowe, szczególnie w krajach rozwiniętych przemysłowo, opracowanie nowej, bardziej efektywnej terapii przeciwnowotworowej staje się imperatywem dla środowiska naukowego i lekarskiego. Światowa Organizacja Zdrowia WHO prognozuje stały dalszy wzrost liczby zachorowań na raka, szacowany na 19.3 mln przypadków rocznie w 2025 roku i spowodowany głównie wzrostem liczebności populacji i jej starzeniem się. Z tego ponad połowa zachorowań (56.8%) i 64.9% zgonów wystąpi w krajach rozwijających się (m.in. w Polsce).

Najnowszym trendem w terapii przeciwnowotworowej w ostatnich latach stało się poszukiwanie związków o ukierunkowanym, proapoptotycznym działaniu, wpływających na aktywność transkrypcyjną genów zaangażowanych w proces apoptozy komórki nowotworowej. Taki mechanizm działania jest bardzo korzystny dla organizmu chorego, gdyż ograniczenie namnażania się komórek nowotworowych i ich stopniowa eliminacja na drodze ukierunkowanej apoptozy nie

wywołuje procesu zapalnego i nie uszkadza sąsiadujących z nowotworem tkanek prawidłowych. Związki tego typu mogą także w dużym stopniu uwrażliwiać komórki nowotworu na terapię.

Badania, stanowiące celem rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Królewskiej mieszczą się w głównym nurcie tych poszukiwań i dotyczą niezwykle istotnego problemu w terapii nowotworów jakim jest selektywne działanie potencjalnego leku na określony typ nowotworu. Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Centrum badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Nawrot, w którym od lat prowadzone są wielokierunkowe badania nad molekularnymi mechanizmami aktywności biologicznej nowych związków o aktywności przeciwnowotworowej. Zespół posiada duże osiągnięcia publikacyjne i patentowe (polskie i europejskie) w tym zakresie, realizuje także szereg projektów badawczych.

Głównym celem pracy doktorskiej było wyselekcjonowanie z puli 80 nowosyntetyzowanych pochodnych benzo[b]furanów i dikarboksyimidów najbardziej aktywnych związków o właściwościach przeciwnowotworowych i niskiej toksyczności wobec komórek prawidłowych jak również zbadanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za te właściwości. Postawiony cel Doktorantka zrealizowała wieloetapowo i konsekwentnie, co umożliwiło Jej uzyskanie bardzo wartościowych i oryginalnych wyników. Badania zostały wykonane na liniach komórek ludzkich we współpracy z Zakładem Chemii Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w ramach dwóch projektów badawczych finansowanych przez PBZ-MNiSW (projekt 07/1/2007/13 pt. "Bifosforany oraz oligonukleotydy i ich kongenery jako diagnostyki oraz leki nowych generacji", zadanie „Opracowanie zasad organizacji laboratorium referencyjnego dla badań właściwości przeciwnowotworowych biofosforanych i ich analogów”) oraz NCN (projekt własny PRELUDIUM (2013-2015) pt. "Związki o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych z grupy pochodnych benzo[b]furanów i dikarboksyimidów – badanie mechanizmu działania w komórkach ludzkich”).

Rozprawa jest dość obszerna, ale napisana poprawnym językiem i przygotowana niezwykle starannie. Treść pracy została podzielona na rozdziały obejmujące streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, wstęp i cel badań, wstęp literaturowy, badania własne, dyskusję, podsumowanie wyników i wnioski, materiały i metody oraz literaturę. Na początku pracy Autorka zamieściła wykaz osiągnięć naukowych, wykaz skrótów i spis treści. Zachowano właściwe proporcje między poszczególnymi rozdziałami. Zagadnienia omówione w części literaturowej łączą się ściśle z głównym tematem rozprawy i celem przeprowadzonych badań. Autorka w sposób ciekawy i zwięzły omawia rodzaje śmierci komórkowej oraz proces apoptozy jako preferowany typ śmierci komórek nowotworowych. Rozdział 4. poświęcony jest regulatorom apoptozy, w rozdziale 5. natomiast zostały omówione główne molekularne regulatory tego procesu. W ostatnim rozdziale części literaturowej Autorka opisuje najważniejsze właściwości biologiczne związków z grupy benzo[b]furanów i dikarboksyimidów, będących przedmiotem rozprawy.

Część teoretyczna pracy napisana jest w sposób interesujący, zawiera najnowszą wiedzę z zakresu omawianych zagadnień oraz starannie wykonane kolorowe schematy i rysunki. Duże wrażenie robi część doświadczalna pracy, przygotowana niezwykle pieczołowicie, z dużą dbałością o szczegóły i zawierająca bogatą dokumentację graficzną i tabelaryczną. Uznanie budzi także dokładność z jaką przygotowano rozdział Materiały i metody, zawierający szczegółowy wykaz stosowanych odczynników, wzorów chemicznych badanych związków i dokładny opis metod. Praca zawiera także obszerny wykaz literatury, liczący 200 pozycji. Większość cytowanych prac stanowią najnowsze publikacje z ostatnich lat.

Należy podkreślić bardzo dobrze przemyślany, logiczny i konsekwentnie zrealizowany plan badań, które Doktorantka rozpoczęła od testowania cytotoksyczności związków, wykonując

w tym celu kolejne badania przesiewowe. Oznaczenie cytotoksyczności wykonała trzyetapowo. Najważniejszym celem pierwszego etapu było wyselekcjonowanie związków nietoksycznych dla komórek prawidłowych, a wykazujących cytotoksyczność zarówno wobec komórek nowotworów litych jak i komórek białaczkowych. Doktorantka wybrała linię komórek zawieszonych K562 przewlekłej białaczki szpikowej, linię nabłonkowych komórek adherentnych HeLa raka szyjki macicy oraz linię HUVEC prawidłowych komórek śródbłonna. W etapie tym wyselekcjonowała 11 związków (4 pochodne benzo[b]furanów i 7 pochodnych dikarboksyimidów). Spośród nich 6 pochodnych benzo[b]furanów i 1 pochodna dikarboksyimidów charakteryzowały się selektywnym działaniem cytotoksycznym w stosunku do komórek białaczkowych (IC<sub>50</sub> zawarte w przedziale 1-10 μM, wyjątek stanowił różniący się strukturą od pozostałych pochodnych dikarboksyimidów związek BK.198.1 HCl, wykazujący IC<sub>50</sub>=100 μM). Jedna pochodna dikarboksyimidów (BK 171.1 HCl) i dwie pochodne benzo[b]furanów (BM 7 oraz BM 8) okazały się cytotoksyczne zarówno dla komórek białaczkowych K562 jak i adherentnych komórek HeLa. Pochodne BK 171.1 HCl i BM 7 wykazywały podobną cytotoksyczność wobec obu typów komórek (IC<sub>50</sub>=1 μM), podczas gdy pochodna BM 8 wykazywała ok. 10-krotnie mniejszą cytotoksyczność w stosunku do komórek HeLa (IC<sub>50</sub>=9 μM), a pochodna BM 3G odwrotnie – ok. 10-krotnie mniejszą cytotoksyczność w stosunku do komórek białaczkowych.

Weryfikacja hipotezy o wybiórczym działaniu cytotoksycznym na komórki białaczkowe większości aktywnych związków, wyselekcjonowanych w pierwszym etapie, wymagała ich dodatkowego przetestowania na komórkach wywodzących się z innych typów białaczek i nowotworów litych. Badania, wykonane przez Doktorantkę w drugim etapie skringingu wykazały, że pochodna BK.198.1 HCl, wykazująca najmniejszą cytotoksyczność wobec komórek K562 przewlekłej białaczki szpikowej, jest nieaktywna w stosunku do komórek innych typów białaczek. Spośród pozostałych pochodnych dikarboksyimidów, działających selektywnie na komórki K562, tylko jeden związek BK 124.1 był cytotoksyczny także i dla pozostałych typów komórek białaczkowych – linii HL-60 ostrej białaczki promielocytarnej (AML) oraz linii MOLT-4 ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL). Związki BK 176.1, BK 176.2, BK 176.4 i BK 176.5 natomiast nie były cytotoksyczne dla komórek HL-60. Związek MKN jako jedyna wyselekcjonowana pochodna benzo[b]furanów, działająca wybiórczo na komórki białaczkowe K562, był także cytotoksyczny i dla pozostałych 2 typów komórek białaczkowych (HL-60 i MOLT-4). Należy podkreślić dużą aktywność cytotoksyczną wyselekcjonowanych związków wobec komórek białaczkowych, znacznie przewyższającą aktywność stosowanych klinicznie leków cytarabiny, sorafenibu czy CPT-11. Co więcej, wyselekcjonowane pochodne nie są toksyczne dla prawidłowych komórek śródbłonna, podczas gdy wszystkie zastosowane leki referencyjne wykazują znacząco toksyczność wobec komórek HUVEC, porównywalna w przypadku doksorubicyny z cytotoksycznością leku wobec komórek białaczkowych, i nawet większa w przypadku bortezomibu.

W dalszych etapach badań Doktorantka we współpracy z innymi ośrodkami naukowymi i przy użyciu najnowszych technik badawczych wykonała szereg bardzo szczegółowych analiz w celu wyjaśnienia molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za aktywność przeciwnowotworową badanych związków. Główne miejsce w tych badaniach zajmuje wyjaśnienie w jakim stopniu wyselekcjonowane pochodne mogą indukować apoptozę komórek nowotworowych i jaki jest mechanizm tego procesu. Ewaluację procesu apoptozy Doktorantka przeprowadziła na podstawie oznaczenia eksternalizacji fosfatydylocholino, która jest jednym z wcześniejszych zjawisk zachodzących podczas apoptozy. Zbadała także aktywność kaspaz 3, 7, 8 i 9, aktywowanych na szlakach receptorowym i mitochondrialnym apoptozy, oraz poziomu ekspresji 96 genów związanych z tym procesem. Zakres zastosowanych w pracy metod (mikroplótkowe metody spektrofotometryczne, cytometria przepływowa, technika

mikromacierzy DNA, technika real-time RT-PCR) jest imponujący. Doktorantka wykonała ponadto badania modelowe, mające na celu wyjaśnienia interakcji badanych związków z DNA, stosując spektroskopową metodę dichroizmu kołowego (CD) oraz analizę restrykcyjną plazmidowego DNA. Na szczególnie podkreślenie zasługuje zastosowanie trudnej do interpretacji metody DARTS do identyfikacji białek komórkowych oddziałujących z badanymi związkami. Wszystkie eksperymenty zostały wykonane niezwykle rzetelnie z zastosowaniem odpowiednich prób kontrolnych i referencyjnych.

Badania aktywności kaspaz w komórkach białaczkowych, traktowanych wyselekcjonowanymi związkami, wykazały ich zróżnicowany wpływ w zależności od typu białaczki oraz struktury chemicznej związku. W przypadku niektórych pochodnych Autorka nie stwierdziła zmian w aktywności kaspaz sugerując, że apoptoza nie odgrywa istotnej roli w cytotoksyczności tych związków i być może powodują one głównie nekrozę komórek nowotworowych. Dotyczy to pochodnych BK 176.1, BK 176.2, BK 176.5 i BK 124.1, dla których nie zaobserwowano wzrostu aktywności kaspazy 3 i 7 w komórkach K562. Bardzo duży wzrost aktywności kaspaz 3 i 7, porównywalny do tego staurosporyny, zaobserwowała natomiast dla pochodnych BK 176.4, MKN, BK 171.1, BK 198.1, BM 7i BM 8, co wskazuje, że ich aktywność przeciwnowotworowa może wynikać z właściwości proapoptotycznych. Komórki MOLT-4 okazały się bardziej wrażliwe na indukcję apoptozy od komórek K562 o czym świadczy kilkakrotnie wyższy, w porównaniu ze staurosporyną, wzrost aktywności kaspaz 3 i 7. Najbardziej aktywne związki MKN (pochodna benzo[b]furanu) i BK 176.4 (pochodna dikarboksyimidu) indukowały apoptozę komórek białaczkowych K563 i MOLT-4 zarówno na szlaku receptorowym jak i mitochondrialnym, powodując wzrost aktywności kaspaz 8 i 9. Wyniki te Doktorantka potwierdziła w badaniach profilu ekspresji genów związanych z apoptozą, w których wykazała znaczący wzrost ekspresji genów *BAX*, *BAD*, *BID*, *BAK*, *BIM*, *PUMA*, *NOXA*, *Smac/DIABLO*, *APAF1*, *PMA/P1* i *HTRA2*, zaangażowanych w szlaku mitochondrialnym apoptozy jak i wzrost ekspresji genów *TNFRSF 10A*, *TNFRSF 10B*, *TNFRSF 21*, *ESRRBL1*, *CASP8* i *CASP 10*, uczestniczących w szlaku receptorowym apoptozy.

W badaniach modelowych nad interakcją badanych pochodnych z DNA Doktorantka wykazała, że jednym z mechanizmów cytotoksyczności związków MKN i BK 176.4 może być deaktywacja DNA poprzez alkilowanie i/lub interkalację tych związków do helisy DNA. Chciałabym również zwrócić uwagę na szczególnie wartościowe wyniki badań SAR, które dostarczają cenne wskazówki do syntezy nowych pochodnych dikarboksyimidów i benzo[b]furanów.

Na szczególne wyróżnienie zasługują także zamieszczone na Ryc. 18-21, opracowane metodą Analizy Metacore, schematy szlaków apoptozy, uwzględniające miejsca wzmożonej ekspresji genów związanych z apoptozą.

Bardzo mocną stroną pracy jest obszerna i świetnie napisana dyskusja, w której Autorka bardzo krytycznie, wnikliwie i logicznie dyskutuje własne wyniki z wynikami innych autorów.

Moje uwagi krytyczne dotyczą kilku drobnych nieścisłości i niezbyt fortunnych sformułowań w tłumaczeniu angielskich skrótów i nazw, jak np. neuronalny inhibitor apoptozy zamiast inhibitor neuronalnej apoptozy dla białka NAIP (białko NAIP znajduje się także w innych komórkach), ludzka linia komórek ostrej białaczki limfoblastycznej itp. W wykazie skrótów Autorka wszędzie podaje ich rozwinięcie w języku angielskim i polskim, natomiast przy skrócie FITC zamieszczono jedynie nazwę polską. W niektórych miejscach tekstu Doktorantka używa zwrotu „związki indukują apoptozę w komórkach nowotworowych”, podczas gdy poprawnym wyrazem jest „indukują apoptozę komórek nowotworowych”. W dyskusji na stronie 102 Autorka pisze, że „po zastosowaniu barwienia komórek jodkiem propidyny i konjugatem aneksyny-V w celu uwidocznienia fosfatydyloseryny, także zauważyłam zwiększoną ilość komórek zarówno wczesno- jak i późno-apoptotycznych”. Chciałabym zaznaczyć, że metoda ta nie umożliwia

odróżnienia komórek wczesno – i późno-apoptotycznych, o czym zresztą Doktorantka sama wspomina w rozdziale Materiał i Metody. Niepoprawne jest też wyrażenie komórki barwione konjugatem aneksyny-V, które Autorka wielokrotnie używa. W pracy zauważyłam także błędy literowe. Wymienione uchybienia dotyczą głównie strony edytorskiej pracy i nie rzutują w żaden sposób na jej wartość.

Podsumowując, jestem pod wrażeniem ogromu pracy badawczej wykonanej przez Doktorantkę, zastosowanych nowoczesnych technik badawczych oraz niezwyklej staranności z jaką przygotowano pracę. Rozprawa doktorska nt: „*Poziom i mechanizm cytotoksyczności związków z grupy benzo[b]furanów i dikarboksyimidów w wybranych liniach komórek nowotworowych*” stanowi bardzo wartościowe i kompletne opracowanie, zawierające ocenę właściwości cytotoksycznych i proapoptotycznych nowych pochodnych benzo[b]furanów i dikarboksyimidów oraz szczegółową analizę procesów molekularnych odpowiedzialnych za aktywność przeciwnowotworową tych związków. Oryginalnym osiągnięciem Autorki i elementem nowości pracy jest wykazanie selektywnego działania pochodnej MKN benzo[b]furanów na komórki trzech różnych typów białaczek – ostrej białaczki promielocytarnej (AML)(linia HL-60), przewlekłej białaczki szpikowej (CML) (linia K562) i ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL)(linia MOLT-4), przy jednoczesnym braku toksyczności wobec komórek nowotworów litych i komórek prawidłowych śródbłonna. Pochodna ta wydaje się najbardziej obiecującym kandydatem do opracowania nowego leku przeciwnowotworowego, tym bardziej, że opisane dotychczas w literaturze związki z grupy pochodnych arylobenzo[b]furanów i hydroksybenzofuranów nie wykazywały selektywnego działania na komórki białaczkowe, jak również na komórki nowotworów litych.

Praca spełnia wszystkie formalne i merytoryczne wymogi stawiane rozprawom doktorskim, a uzyskane wyniki stanowią oryginalny i istotny wkład Doktorantki w dziedzinie badań nad molekularnymi mechanizmami aktywności biologicznej związków z grupy benzo[b]furanów i dikarboksyimidów w ludzkich komórkach nowotworowych i prawidłowych. Autorka wykazała duże umiejętności eksperymentalne, zdolność właściwego planowania badań i rzetelnej analizy uzyskanych wyników jak również wnikliwość i krytycyzmw ich interpretacji. Jej dorobek naukowy można określić jako znaczny dla tak młodego naukowca. Jest współautorem 11 prac eksperymentalnych, 3 prac przeglądowych, 6 doniesień konferencyjnych (2 na konferencjach krajowych i 4 na konferencjach międzynarodowych) oraz 2 patentów europejskich i 3 krajowych zgłoszeń patentowych. Uczestniczyła także w 2 projektach finansowanych przez NCN, 1 projekcie realizowanym dla firmy farmaceutycznej ADAMED oraz 1 projekt finansowany przez PBZ-MNiSW. Jest również beneficjentem nagrody zespołowej (brązowy medal za patent) otrzymanej na International Innovation & Technology Exhibition w Malesji (9-11.05.2013).

W związku z powyższym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi wysoce pozytywną recenzję przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej i prosić Wysoką Radę o dopuszczenie jej Autorki mgr Karoliny Królewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoki poziom merytoryczny, oryginalny i nowatorski charakter badań oraz ich duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



Dr hab. Aneta Koceva-Chyła, prof. nadzw. UŁ

