



Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Zakład Chemii Biomolekularnej

ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; tel. +4842 272 5706; fax +4842 272 5694

Prof. dr hab. n. med. Anna Janecka

Łódź, 23.1.2015

OCENA

pracy doktorskiej mgr Karoliny Królewskiej

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

Poszukiwania nowych strategii terapeutycznych chorób nowotworowych są przedmiotem badań wielu laboratoriów na świecie. W badaniach tych wykorzystywane są zarówno związki naturalne, izolowane z roślin, jak również różne klasy związków syntetycznych. W tym drugim przypadku zespół syntetyczny wybiera zwykle określony szkielet, na bazie którego można otrzymać szeroką gamę pochodnych, różniących się podstawnikami. Pozwala to na optymalizację wybranych struktur pod kątem pożądanego efektu biologicznego i w konsekwencji terapeutycznego.

W ten tak ważny nurt poszukiwań związków mogących znaleźć zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej wpisuje się tematyka rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Królewskiej wykonana w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Nawrot. Doktorantka w swojej dysertacji skoncentrowała się na związkach syntetycznych, posiadających motyw benzo[b]furanu lub dikarboksyimidu. Pierwszym etapem pracy była ocena cytotoksyczności 80 pochodnych, zsyntetyzowanych w Zakładzie Chemii Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, w dwóch liniach nowotworowych, zawiesinowej linii K562 chronicznej białaczki typu CML i adherentnej HeLa oraz w komórkach prawidłowych HUVEC. Szkoda, że z Tabeli 1 nie wynika, które związki są pochodnymi benzo[b]furanu, a które dikarboksyimidów. Badania prowadzone w szerokim zakresie stężeń pozwoliły na wyselekcjonowanie 11 związków cytotoksycznych dla komórek nowotworowych, ale oszczędzających komórki prawidłowe HUVEC. Związki te były dalej badane w teście MTT na dwóch innych liniach komórek ostrych białaczek typu

ALL i AML, odpowiednio MOLT-4 i HL-60 oraz na adherentnych komórkach nowotworowych trzustki CFPAC. Za punkt odniesienia w badaniach cytotoxycywności przyjęto wartości IC_{50} otrzymane dla znanych leków przeciwnowotworowych, takich jak doxorubicyna, cytarabina czy bortezomid. Z tej zawężonej grupy związków wybrano następnie trzy, które były dalej badane pod kątem indukcji apoptozy na 3 liniach nowotworowych.

Należy zauważyć, że wybrane związki charakteryzowały się wyjątkowo dużą selektywnością działania i nie były toksyczne dla zdrowych komórek w stężeniach do 1 mM. Ta cecha nowych analogów nie jest wprawdzie zasługą Doktorantki, ale z pewnością możliwość badania związków o tak dużej selektywności podnosi wartość otrzymanych wyników.

W logicznie zaplanowanych badaniach zanalizowano następnie wpływ trzech wybranych związków na indukcję apoptozy i poziom kaspazy 8 i 9, w celu ustalenia szlaków sygnalizacyjnych cytotoxycywnego działania analogów. Badania przeprowadzono za pomocą nowoczesnych, adekwatnych do postawionych zadań badawczych metod biologii komórki i biologii molekularnej.

W przypadku wszystkich trzech badanych związków wykazano, że indukują apoptozę w komórkach nowotworowych zarówno na drodze wewnętrznej, mitochondrialnej, jak i zewnętrznej, poprzez receptory śmierci. Zaobserwowano też różnice we wrażliwości komórek białaczkowych badanych linii na indukcję apoptozy.

Wykorzystując mikromacierze DNA zbadano profil ekspresji genów zaangażowanych w proces apoptozy w linii białaczkowej K562 po inkubacji komórek z najlepszym analogiem z grupy benzo[b]furaów i dikarboksyimidów. Zaobserwowany wzrost ekspresji niektórych genów został następnie określony ilościowo techniką PCR w czasie rzeczywistym. Udowodniono, że obydwa związki indukują ekspresję na poziomie mRNA genów *Bax*, *Bad* itp., uczestniczących w szlaku mitochondrialnym apoptozy, a także genów z rodziny *TNFRSF* i *CASP* biorących udział w szlaku receptorowym.

Z uwag technicznych nasuwa mi się pytanie dlaczego w testach związanych z procesem apoptozy dodawano badane związki w stężeniach $5 \times IC_{50}$? Takie stężenie wydaje się być bardzo wysokie. Czy wynikało to z jakichś wcześniejszych ustaleń? A w jaki sposób wybierano czas inkubacji?

Ciekawym dodatkiem do zaplanowanych badań było wykorzystanie dichroizmu kołowego. Na podstawie otrzymanych widm Doktorantka pokusiła się o przypuszczenie, że

mechanizm cytotoksycznego działania dwóch wybranych związków może być związany z uszkodzeniem DNA poprzez alkilację lub interkalację.

Przeprowadzona analiza cytotoksycznego działania dużej grupy związków dostarczyła bardzo obiecujących wyników z punktu widzenia terapeutycznego.

Licząca 161 stron rozprawa mgr Karoliny Królewskiej ma klasyczny układ. Rozpoczyna ją część teoretyczna, w kolejnych rozdziałach której Doktorantka wyczerpująco omówiła rodzaje śmierci komórki, ze szczególnym uwzględnieniem apoptozy, a także zapoznała czytelnika z gamą naturalnych związków pochodzenia roślinnego, zawierających w swej strukturze motyw benzo[b]furanu i dikarboksyimidu, omawiając również syntetyczne analogi tych związków. Wybór zagadnień przedstawionych w części teoretycznej świadczy o właściwym zrozumieniu roli tej części dysertacji, stanowiącej wprowadzenie i uzasadnienie podjętych w pracy doktorskiej badań. Poszczególne zagadnienia opisane zostały w sposób przejrzysty i kompetentny.

Cel pracy został jasno sformułowany, a kolejne, właściwie zaplanowane zadania badawcze w pełni uzasadnione. Rozdział *Materiały i Metody* precyzuje szczegóły stosowanych technik badawczych, pozwalających monitorować zmiany zachodzące w komórkach pod wpływem analizowanych związków. Aktywność cytotoksyczną oceniano za pomocą testu MTT, aktywność kaspazy 3 i 7 poprzez pomiar natężenia fluorescencji, a aktywność proapoptotyczną techniką cytometrii przepływowej przy użyciu aneksyny V i jodku propidyny. Profil ekspresji genów zaangażowanych w proces apoptozy określono metodą z wykorzystaniem mikromacierzy, a ekspresję wybranych genów metodą PCR w czasie rzeczywistym. Próby identyfikacji białek komórkowych oddziałujących z badanymi związkami metodą DARTS nie powiodły się.

Wyniki przeprowadzonych badań zaprezentowane zostały w sposób bardzo przejrzysty, w formie graficznej, najczęściej rycin i zawarte w kilku tabelach. W 12-stronicowej *Dyskusji* Doktorantka dokonała omówienia otrzymanych wyników w porównaniu z przeciwnowotworowymi właściwościami opisanych w literaturze związków o tym samym rdzeniu strukturalnym. Sformułowane w pracy wnioski znajdują potwierdzenie w uzyskanych danych eksperymentalnych.

Praca przygotowana jest z dużą starannością. Drobne uchybienia wynikają zapewne z edycji tekstu. Piśmiennictwo jest jednolite i podane zgodnie z obowiązującym sposobem zapisu.

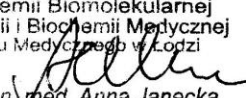
Podsumowując stwierdzam, że wysoko oceniam przedstawioną mi do recenzji pracę mgr Karoliny Królewskiej. Zbadanie cytotoksyczności dużej liczby związków na kilku

liniach komórkowych i porównanie z ich działaniem na komórki prawidłowe dostarczyło oryginalnych wyników o niepodważalnej wartości poznawczej.

Przedstawiony na początku dysertacji dorobek publikacyjny Doktorantki zawiera aż 15 pozycji literaturowych. W niektórych z nich, jak się domyślam, opublikowane są dane dotyczące cytotoksyczności związków opisanych w dysertacji. Szkoda tylko, że Doktorantka przed obroną nie zdążyła opublikować pierwszo-autorskiej pracy z otrzymanych wyników, co z pewnością byłoby ukoronowaniem przedstawionej mi do oceny dysertacji. Sformułowania „manuskrypt w ewaluacji” czy „publikacja w druku” nie są wystarczające i nie powinny znaleźć się w spisie dorobku naukowego Doktorantki. Jeśli publikacja jest przyjęta do druku to należy podać numer DOI. Ważnym uzupełnieniem dorobku Doktorantki jest Jej udział w pięciu patentach, z czego dwa są patentami europejskimi.

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Królewskiej stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego i wnosi cenny wkład w badanie nowych potencjalnych związków o właściwościach przeciwnowotworowych. Ze względu na szeroki panel analizowanych związków i zastosowanych metod badawczych, a także bardzo staranne przygotowanie rozprawy, uważam pracę doktorską za wyróżniającą.

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do recenzji Rozprawa Doktorska mgr Karoliny Królewskiej w pełni spełnia wymagania stawiane Kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Wnoszę więc do Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi o dopuszczenie mgr Karoliny Królewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK
Zakładu Chemii Biomolekularnej
Katedry Chemii i Biochemii Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Prof. dr hab. n. med. Anna Janecka