Prof. dr hab. Monika Wujec
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin, 14.08.2018

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Natalii Pawłowskiej, wykonanej w Zakładzie Syntezy i Technologii Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Liczba chorych na nowotwory wciąż rośnie. Pomimo ogromnego postępu, jaki dokonał się w medycynie, czy to na polu chirurgii, czy też radio- i farmakoterapii, nie jesteśmy w stanie znaleźć skutecznej broni. Wiele laboratoriów badawczych na całym świecie zajmuje się poszukiwaniem nowych terapii, nowych leków przeciwnowotworowych.

W Zakładzie Syntezy i Technologii Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku od wielu lat prowadzone są intensywne badania nad nowymi substancjami, w tym o działaniu przeciwnowotworowym. Prof. Krzysztof Bielawski, będący promotorem przedstawionej do recenzji rozprawy, ma na tym polu znaczące osiągnięcia. Można tutaj chociażby wspomnieć o berenilowych kompleksach platyny.

Kontynuując badania nad nowymi związkami o działaniu przeciwnowotworowym, jako strukturę wiodącą wytypowano substancję pochodzenia naturalnego: trabektedynę. Jest to alkaloid tetrahydroizochinolinowy o wielokierunkowym mechanizmie działania. Stosowany w lecznictwie u pacjentów z zaawansowanym mięsakiem tkanek miękkich. Pomimo bardzo wielu cech korzystnych, trabektedyna stosowana jest rzadko, a to z uwagi na ogromne koszty pozyskiwania jej z natury. Budowa chemiczna trabektedyny jest dość skomplikowana, stąd brak możliwości otrzymania jej na drodze syntezy, jednak syntetyczne pochodne, o uproszczonej budowie, zachowują właściwości przeciwnowotworowe (Zhu i wsp. 2017).

Cel recenzowanej pracy doktorskiej jest jasno określony. Dotyczy oceny właściwości przeciwnowotworowych pochodnych oktahydropirazyno[2,1-a:5,4-a']diizochinoliny oraz poznania mechanizmu ich działania.

Praca doktorska jest opracowana w sposób klasyczny. Zawiera wstęp, opis stosowanych metod i materiałów, omówienie wyników, dyskusję oraz wnioski. Opatrzona jest również streszczeniem w języku polskim i angielskim.

W części wprowadzającej Autorka opisuje proces apoptozy: zmiany biochemiczne i morfologiczne zachodzące podczas śmierci komórki oraz charakteryzuje mechanizm apoptozy, wskazując na możliwość wykorzystania programowanej śmierci komórki jako celu terapii antynowotworowych. Podaje również charakterystykę alkaloidów tetrahydroizochinolinowych oraz wyczerpujący opis mechanizmu działania przeciwnowotworowego trabektedyny, jako sztandarowego przedstawiciela tejże grupy. Należy w tym miejscu zwrócić uwagę na aktualność cytowanej w pracy literatury. Praktycznie wszystkie pozycje są datowane na ostatnie 18 lat.

W badaniach wykorzystano związki otrzymane w Instytucie Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk, posiadające w swojej strukturze dwa skondensowane pierścienie tetrahydroizochinolinowe, różniące się charakterem podstawników. Pierwszy etap pracy obejmował wstępne badania cytotoksyczności, które pozwoliły na wyselekcjonowanie z 55. nowych pochodnych 7. związków o najwyższej potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej do dalszych badań. Czytając rozdział na temat badań przesiewowych nasunęło mi się pytanie: dlaczego Doktorantka wytypowała związki do dalszych badań na podstawie oznaczenia cytotoksyczności tylko w stosunku do estrogenozależnych komórek raka sutka MCF-7, jeśli zaplanowane były badania również w kierunku estrogenoniezależnego raka sutka?

Dalsze badania biologiczne przeprowadzono na dwóch liniach komórek raka piersi: estrogenozależnych MCF-7 oraz estrogenoniezależnych MDA-MB-231 oraz z uwagi na fakt, iż najbardziej pożądane są nowe leki o działaniu wybiórczym tylko na komórki nowotworowe, badano wpływ nowych pochodnych na komórki prawidłowe - fibroblasty skóry ludzkiej. Oceniano wpływ nowych pochodnych na główne szlaki procesu apoptozy, a także porównano wpływ nowych połączeń na cytotoksyczność oraz proces biosyntezy DNA w komórkach nowotworowych. Poddano również ocenie zmiany potencjału mitochondrialnego oraz aktywność kaspaz 3, 8, 9 i 10. Jako substancje referencyjne zastosowano kaptotecynę oraz etopozyd.

Przeprowadzone przez mgr Natalię Pawłowską badania wykazały wyższą cytotoksyczność, w stosunku do obu linii komórek nowotworowych, czterech nowych pochodnych w porównaniu do substancji referencyjnych. Najbardziej aktywny związek OM-90 posiada 4 grupy

hydroksylowe w pierścieniach fenylowych. Cechuje się najwyższą cytotoksycznością w stosunku do linii MCF-7 (czterokrotnie wyższą niż kaptotecyna oraz pięciokrotnie niż etopozyd) oraz najniższą toksycznością spośród badanych związków w stosunku do komórek prawidłowych.

Właściwości antyproliferacyjne Doktorantka potwierdziła oceniając wpływ związków syntetycznych na biosyntezę DNA, poprzez ocenę stopnia wbudowania [^{3}H]-tymidyny do DNA badanych komórek. Badanie to wykazało, iż 3 spośród badanych związków silniej hamowały biosyntezę DNA niż związki referencyjne. W tym miejscu nasuwa się pytanie w jakim stopniu badane związki hamują proces biosyntezy DNA w fibroblastach skóry ludzkiej? Kolejne etapy pracy badawczej koncentrują się na badaniu wpływu wyselekcjonowanych związków na proces apoptozy. Z danych literaturowych wynika, iż pochodne tetrahydroizochinolinowe indukują proces apoptozy. Badania Mgr Natalii Pawłowskiej przeprowadzone techniką cytometryczną, poparte badaniami z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego wykazały, iż wszystkie pochodne są zdolne do inicjacji apoptozy w badanych liniach komórkowych. Cztery spośród testowanych związków silniej indukowały apoptozę niż kamptotecyna i etopozyd. Stwierdzono ponadto, że proces apoptozy wywołany przez pochodne oktahydropirazyno[2,1-a:5,4-a']diizochinoliny przebiega zarówno według wewnętrznego szlaku indukcji apoptozy, obejmującego spadek mitochondrialnego potencjału błonowego i aktywację kaspazy 9, jak i według szlaku zewnętrznego z aktywacją kaspazy 8 i 10.

Reasumując, niezwykle obszerne badania przeprowadzone przez mgr Natalię Pawłowską pozwoliły stwierdzić, że cytotoksyczne działanie badanych związków można wiązać z ich zdolnością do upośledzenia biosyntezy DNA oraz indukcją procesu apoptozy. Uzyskane wyniki badań pozwoliły na wyselekcjonowanie jednego związku opatrzonego symbolem OM-90 o najwyższej aktywności, który może posłużyć jako struktura wiodąca do dalszych badań.

Podsumowując, pod względem merytorycznym praca nie budzi zastrzeżeń. Jak na tak obszerne opracowanie jest w niej bardzo niewiele błędów stylistycznych (znalazłam tylko 8), stąd nie będę ich przytaczać. Zwrócę tylko uwagę na dwie nieścisłości. Doktorantka pisze, iż badaniom poddała 9 związków, a w rzeczywistości jest ich 7 oraz PAN to Polska, a nie Państwowa Akademia Nauk.

Na szczególną uwagę zasługuje rozdział Dyskusja, będący podsumowaniem prowadzonych badań. Autorka prowadzone przez siebie badania konfrontuje z koncepcjami naukowi i

uznanymi hipotezami. Wykazała się przy tym umiejętnością raportowania wyników pracy naukowej.

Rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko, uważam ją za niezwykle interesującą oraz nowatorską, w pełni spełniającą wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Ze względu na te walory, pragnę rekomendować rozprawę doktorską mgr Natalii Pawłowskiej do wyróżnienia.

Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie mgr Natalii Pawłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz nadanie jej stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Monika Sujka