

Prof. dr hab. Monika Wujec

Lublin, 5.07.2019

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Czajkowskiej wykonanej w Samodzielnej Pracowni  
Biotechnologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Świat roślin jest wciąż bezcennym źródłem leków. Dotychczas wykryto blisko 600 substancji o właściwościach przeciwnowotworowych w około 300 gatunkach roślin, szacuje się jednak, iż może je zawierać nawet 2/3 roślin europejskich. Paklitaksel, winkrystyna, winblastyna oraz pochodne kamptotecyny i podofilotoksyny są substancjami pochodzenia roślinnego, stosowanymi obecnie w leczeniu nowotworów. W 2012 roku zatwierdzono homoharringtoninę, będącą alkaloidem występującym w kilku gatunkach z rodzaju *Cephalotaxus* w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej odpornej na inhibitory kinazy tyrozynowej. Wiele związków pochodzenia roślinnego znajduje się w trakcie badań klinicznych jako potencjalne leki onkologiczne. Są to m.in. kombretastatyna A4 i A1 (w postaci proleków), genisteina, resweratrol, kurkumina oraz analogi wyżej wymienionych leków.

Jedną z roślin, które znajdują się już od wielu lat w kręgu zainteresowania badaczy jest czarnuszka siewna. *Nigella sativa* jest bardzo cennym surowcem roślinnym. Zastosowanie lecznicze znalazły przede wszystkim nasiona, a dokładniej olej z nich. Badania wskazały na obecność w nim olejku eterycznego, w skład którego wchodzi m.in. tymochinon oraz alfa-hederyna, którym to właśnie przypisywana jest aktywność przeciwnowotworowa.

Nie dziwi więc fakt zainteresowania tą właśnie rośliną zespołu badawczego pod kierownictwem Prof. Anny Bielawskiej. Wymiernym efektem badań zrealizowanych w zespole nad właściwościami przeciwnowotworowymi czarnuszki jest przedłożona do oceny rozprawa doktorska pani mgr Anny Czajkowskiej.

Przedłożona do oceny praca jest opracowana w sposób klasyczny. Zawiera wstęp, cel pracy, opis stosowanych metod i materiałów, omówienie wyników, dyskusję oraz wnioski.

W części wprowadzającej autorka bardzo szczegółowo charakteryzuje czarnuszkę, z uwzględnieniem składu chemicznego poszczególnych .....farmakopealnych. Opisuje surowce roślinne zawierające alkaloidy izochinolinowe o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej. Ponadto, przedstawia znaczenie mucyn w procesie nowotworzenia. Ta część pracy w sposób wyczerpujący uzasadnia trafność podjętej tematyki badawczej, której celem była ocena skojarzonego działania oleju z nasion czarnuszki siewnej *Nigella sativa* z nowym analogiem alkaloidów izochinolinowych na proces apoptozy w komórkach raka żołądka AGS.

Cel ten został zrealizowany poprzez realizację następujących zadań badawczych.

- ocenę aktywności biologicznej oleju z nasion czarnuszki siewnej *Nigella sativa*
- poznanie molekularnego mechanizmu działania tegoż oleju
- ocenę aktywności przeciwnowotworowej nowej syntetycznej pochodnej oktahydropirazyno[2,1-a:5,4-a']diizochinoliny (OM-90)
- ocenę synergizmu działania oleju z czarnuszki z OM- 90
- ocenę synergizmu działania oleju z etopozydem.

Badania aktywności prowadzono wobec komórek raka żołądka AGS-CRL-1739. Oceny cytotoksyczności badanych związków dokonano zgodnie z metodą Carmichael'a, określając żywotność komórek hodowanych *in vitro* przy użyciu soli tetrazolowej (MTT). W celu potwierdzenia, że badane związki hamują proliferację komórek AGS, oceniono ich wpływ na proces biosyntezy DNA. Właściwości antyproliferacyjne określono poprzez ocenę stopnia wbudowania [<sup>3</sup>H]tymidyny do DNA badanych komórek. Oceniono także wpływ badanych związków na zmiany w morfologii komórek. Dokonano oceny wpływu oleju z nasion czarnuszki siewnej w formie monoterapii oraz w skojarzeniu ze związkiem OM-90 na wybrane znaczniki biochemiczne programowanej śmierci komórki, takie jak: utrata asymetrii rozmieszczenia fosfolipidów błony komórkowej, obniżenie potencjału mitochondrialnego, ekspresja kaspaz inicjatorowych 8 i 9, egzekutorowej kaspazy-3 oraz proapoptotycznego białka p53. Określono także ekspresję wybranych białek przekąźnikowych, uczestniczących w regulacji przeżywalności komórek, jak kinaza AKT oraz ERK1/2.

Istotnym zagadnieniem jest także zablokowanie ekspresji transbłonowej glikoproteiny MUC1, która jest jednym z najbardziej obiecujących celów molekularnych dla leków przeciwnowotworowych. Zmiany w glikozylacji oraz nadmierna ekspresja MUC1 w

komórkach nowotworowych korelują z ich wzmożoną inwazyjnością, oraz wzrostem potencjału migracyjnego. Oceniono wpływ monoterapii olejem z nasion czarnuszki, jak i terapii skojarzonej ze związkiem OM-90 na ekspresję genu *MUC1* oraz poziom ekspresji domeny cytoplazmatycznej mucyny transbłonowej MUC1.

Badania przedstawione powyżej są kompletnym panelem pozwalającym na wyciągnięcie miarodajnych wniosków, co do aktywności cytotoksycznej. Doktorantka stwierdziła, iż olej z nasion czarnuszki siewnej *Nigella sativa* zastosowany z nową syntetyczną pochodną oktahydropirazyνο[2,1-a:5,4-a']diizochinolinyl (OM-90) wykazuje silniejszą aktywność cytotoksyczną i antyproliferacyjną w porównaniu do terapii skojarzonej przy użyciu oleju z nasion czarnuszki siewnej z etopozydem oraz do monoterapii badanymi związkami w komórkach raka żołądka AGS. Wniosek ten świadczy o właściwych założeniach towarzyszących formułowaniu celów niniejszej rozprawy.

Stwierdzono ponadto, że proces apoptozy wywołany przez w wyniku zastosowania oleju z nasion *Nigella sativa* w skojarzeniu z nowym analogiem alkaloidów izochinolinowych (OM-90) przebiega zarówno według wewnętrznego szlaku indukcji apoptozy, obejmującego spadek mitochondrialnego potencjału błonowego i aktywację kaspazy 9, jak i według szlaku zewnętrznego z wyraźnym wzrostem ekspresji kaspazy 8.

Liczne badania wskazują na zwiększoną aktywność kinaz AKT, ERK1/ERK2 w wielu typach komórek nowotworowych, co prowadzi do wzmożonej proliferacji i przeżycia tych komórek. Wyniki badań wskazują, iż, terapia skojarzona przy użyciu oleju z nasion czarnuszki siewnej łącznie z nową syntetyczną pochodną izochinolinową (OM-90) prowadzi do obniżenia ekspresji kluczowych białek przekazywania sygnałowego, jak kinaza AKT oraz ERK1/2. Potwierdzono również udział MUC1 w stymulacji szlaków PI3K-AKT oraz RAS-RAF-MEK-ERK, poprzez które promuje ona wzrost i przetrwanie komórek nowotworowych.

W tym miejscu chciałabym zadać pytanie: Czy Doktorantka zbadała wpływ oleju z czarnuszki, oraz pochodnej izochinolinyl OM-90 na komórki prawidłowe? Jeśli tak, to jakie były wyniki? Jeśli nie, to dlaczego?

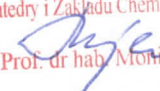
Dodatkowym elementem pracy mgr Anny Czajkowskiej było opracowanie nowego systemu dostarczania leków opartego na nanocząstkach fosfolipidowych. Rdzeń nanocząstek składał się z oleju z nasion czarnuszki siewnej. Stabilizującą powłokę nanoemulsji stanowiła mieszanina fosfolipidów. Dodatkowo układ wzbogacono o badaną pochodną izochinolinyl (OM-90) lub etopozyd (ET). Zsyntetyzowano sześć różnych rodzajów nanoemulsji. Jest to

część pracy o dużym potencjale aplikacyjnym. Nowoczesne nanosystemy są doskonałym narzędziem usprawniającym dostarczanie leków do komórek rakowych. Zwiększają biodostępność substancji leczniczych, często dzięki zmianie rozpuszczalności oraz ograniczają ich uwalnianie do krwioobiegu, co prowadzi do wyższej skuteczności terapeutycznej *in vivo* i mniejszych działań niepożądanych leku.

Reasumując, zamierzeniem pracy badawczej było stworzenie kombinacji oleju z nasion *Nigella sativa* łącznie ze związkiem OM-90, która w wyniku synergii działania powinna charakteryzować się szerszym spektrum aktywności przeciwnowotworowej w porównaniu do terapii skojarzonej z zastosowaniem oleju z nasion *Nigella sativa* z etopozydem oraz do monoterapii każdym z badanych związków. W mojej opinii cel został osiągnięty. Czarnuszka siewna jest tanim surowcem farmaceutycznym, łatwym do pozyskania. Połączenie oleju z lekami syntetycznymi daje możliwość obniżenia stosowanych dawek leku, a co za tym idzie zmniejszenia możliwych działań niepożądanych i toksyczności syntetyków.

Podsumowując, rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko, uważam ją za nowatorską i niezwykle interesującą, w pełni spełniającą wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Ze względu na te walory, pragnę rekomendować rozprawę doktorską mgr Anny Czajkowskiej do wyróżnienia.

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

Kierownik  
Katedry i Zakładu Chemii Organicznej  
  
Prof. dr hab. Monika Wujec