

Kraków, 24.07.2018



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.:
*„Mechanizm przeciwnowotworowego działania
pochodnych oktahydropirazylo[2,1- α :5,4- α']diizochinoliny
w komórkach raka sutka MCF-7 i MDA-MB-231”*
wykonanej przez **mgr Natalię Pawłowską**
w Zakładzie Syntezy i Technologii Środków Leczniczych
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Wydział Farmaceutyczny

Zakład Biochemii

Farmaceutycznej

Przedstawiona do oceny praca Pani mgr Natalii Pawłowskiej reprezentuje problematykę badawczą z zakresu poszukiwania nowych skutecznych związków o działaniu przeciwnowotworowym. Pomimo olbrzymiego postępu w zakresie terapii chorób nowotworowych problem opracowywania nowych strategii leczenia, w tym także środków leczniczych o korzystniejszym profilu farmakologicznym wykazujących selektywność działania w stosunku do komórek nowotworowych stanowi ciągle bardzo aktualny i poważny problem naukowy.

Od kilkunastu lat obserwuje się wyraźny wzrost zainteresowania potencjałem terapeutycznym substancji zawartych w organizmach morskich, które są cennym źródłem unikalnych związków chemicznych, rozpoznanych ciągle tylko w niewielkim stopniu. Ostatnie lata wyłoniły spośród nich szereg nowych cząsteczek o udowodnionej silnej aktywności przeciwnowotworowej. W grupie pierwszych leków wykorzystywanych w onkologii pozyskanych z organizmów morskich znalazły się trabektedyna, cytarabina oraz mesylan eribuliny.

Trabektedyna, alkaloid, należący do grupy ekteinascydyn posiada status leku sierociego w terapii raka jajnika oraz rejestrację do leczenia pacjentów z zaawansowanym mięsakiem tkanek miękkich. Mechanizm działania trabektedyny jest wieloaspektowy. Polega na oddziaływaniu z mniejszą bruzdą podwójnej helisy DNA, a powstający addukt trabektedyna-DNA inicjuje kaskadę zdarzeń, które zakłócają prawidłowe

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 77

+48 12 620 55 98

fax: +48 12 620 55 77

elzbieta.pekala@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl

funkcjonowanie niektórych czynników transkrypcyjnych, a także białek zaangażowanych w systemy naprawy DNA. Skutkiem tego jest zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₂/M, co w konsekwencji prowadzi do zaprogramowanej śmierci komórek – apoptozy. Trabectedyna oddziałuje także na mikrośrodowisko guza, poprzez zmniejszenie produkcji głównych mediatorów zapalnych.

Wysoka cena preparatów z grupy ekteinascydyn związana z kosztami ich izolacji z organizmów morskich ogranicza jednak ich powszechne stosowanie w terapii i badaniach. Stąd prace nad syntezą chemiczną analogów tych związków pozyskanych pierwotnie z zasobów naturalnych są niezwykle wartościowe.

Wpisując się w ten obszar działania Doktorantka podjęła badania *in vitro* nad aktywnością biologiczną otrzymanych na drodze syntezy chemicznej pochodnych oktahydropirazyνο[2,1-a:5,4-a']diizochinoliny wykazujących szczególne podobieństwo do trabectedyny, która w swojej strukturze posiada skondensowany układ dwóch tetrahydroizochinolin zapewniający wysoką aktywność przeciwnowotworową. Głównym celem pracy była ocena właściwości przeciwnowotworowych względem linii estrogenozależnych komórek raka sutka MCF-7 oraz estrogenoniezależnych komórek raka sutka MDA-MB-231, a także poznanie szczegółowego mechanizmu działania siedmiu wyselekcjonowanych, najaktywniejszych związków z grupy pochodnych oktahydropirazyνο[2,1-a:5,4-a']diizochinoliny.

Uważam, że podjęta przez Autorkę tematyka badań oraz postawione zadania i cele są jak najbardziej aktualne i uzasadnione, a otrzymane rezultaty posiadają duże możliwości aplikacyjne.

Praca zawiera 146 stron maszynopisu w typowym układzie: Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bogate Piśmiennictwo liczące 223 pozycje bibliograficzne.

Wstęp został zredagowany w jasny i syntetyczny sposób (30 stron), zawiera istotne aktualne informacje dotyczące mechanizmów programowanej śmierci komórki - apoptozy oraz mechanizmów działania jednego z głównych przedstawicieli alkaloidów tetrahydroizochinolinowych o właściwościach przeciwnowotworowych - trabectedyny.

Cel oraz zakres zaplanowanych badań, a także dobór testów biochemicznych, metod analitycznych i statystycznych został przedstawiony logicznie i klarownie.

W pierwszej kolejności Doktorantka oceniła aktywność cytotoksyczną nowych pochodnych metodą Carmichael'a przy użyciu soli tetrazolowej (test MTT), a następnie właściwości antyproliferacyjne potwierdziła szacując hamowanie biosyntezy DNA, opierając

się na pomiarze wbudowywania znakowanej radioaktywnie tymidyny do DNA komórek raka sutka po inkubacji z pochodnymi diizochinoliny.

Indukcję apoptozy oceniła stosując metodę z aneksyną V i jodkiem propidyny wykorzystując technikę cytometryczną, a następnie potwierdziła metodą mikroskopu fluorescencyjnego. Zbadała także wpływ testowanych związków na wybrane biochemiczne markery apoptozy, takie jak: utrata symetrii rozmieszczenia fosfolipidów błony komórkowej, zmiana mitochondrialnego potencjału błonowego ($\Delta\Psi_m$), aktywność kaspaz inicjatorowych 9, 8, 10 oraz aktywację egzekutorowej kaspazy 3.

Wyniki badań opisano na str. 49-112. Doktorantka spośród 55 nowych cząsteczek z grupy pochodnych diizochinoliny, które otrzymano we współpracy z Instytutem Chemii Organicznej PAN na drodze badań przesiewowych wyłoniła siedem (OM-48, OM-71, OM-86II, OM-90, OM-140, OM-141, RC-27) o najwyższej aktywności cytotoksycznej w stosunku do estrogenozależnych komórek raka sutka MCF-7.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że badane związki obniżają przeżywalność komórek nowotworowych w większym stopniu niż w prawidłowych fibroblastach skóry ludzkiej, co świadczy o selektywności ich działania. Nowe pochodne oktahydropirazyno[2,1-a:5,4-a']diizochinoliny również silniej hamowały biosyntezę DNA w komórkach MCF-7 oraz MDA-MB-231 niż związki referencyjne kamptotecyna i etopozyd.

Bardzo ciekawe i wartościowe wyniki uzyskała Autorka prowadząc badania nad mechanizmem działania wyselekcjonowanych związków vs. estrogenozależne MCF-7 oraz estrogenoniezależne MDA-MB-231 komórki raka sutka. Analiza otrzymanych danych pozwoliła stwierdzić, że mechanizm działania przeciwnowotworowego nowych pochodnych oktahydropirazyno[2,1-a:5,4-a']diizochinoliny jest związany z indukcją apoptozy w komórkach estrogenozależnego MCF-7 oraz estrogenoniezależnego MDA-MB-231 raka sutka. Apoptoza indukowana w komórkach nowotworowych pod wpływem związków: OM-48, OM-71, OM-86II, OM-90, OM-140, OM-141, RC-27 przebiegała zarówno drogą zewnątrzpochodną, która manifestuje się spadkiem mitochondrialnego potencjału błonowego oraz aktywacją kaspazy 9 oraz drogą zewnątrzpochodną poprzez wyraźny wzrost ekspresji kaspaz 8 i 10.

W mojej opinii najcenniejszym wynikiem i największym osiągnięciem pracy było wyselekcjonowanie z grupy testowanych związków pochodnej OM-90 charakteryzującej się najsilniejszymi właściwościami przeciwnowotworowymi oraz wysoką aktywnością proapoptotyczną w liniach nowotworowych raka sutka. Cytotoksyczność związku OM-90 była najwyższa, wartość IC_{50} w komórkach MCF-7 wynosi 24 μM , a w komórkach MDA-MB-231 14 μM . Wartości IC_{50} wyznaczone dla związków referencyjnych, etopozydu

i kamptotecyny, były odpowiednio w komórkach MCF-7 oraz w MDA-MB-231 od 4-5 do 6-7 razy wyższe.

W dysertacji Doktorantka zawarła także niezwykle interesujące wyniki dla związków OM-48 oraz OM-141 wynikające z rozwoju i kontynuacji badań prowadzonych nad aktywnością przeciwnowotworową w modelu doświadczalnym ludzkiego raka żołądka (AGS). Wraz ze wzrostem stężenia oba testowane związki obniżały żywotność i upośledzały biosyntezę DNA w komórkach raka żołądka, szczególnie nasilony efekt obserwowano po 48 godzinnej inkubacji. Badania wykazały, że obie pochodne prowadzą do wzrostu ekspresji kaspazy inicjatorowej 8 i kaspazy egzekutorowej 3, a także białka p53. Ponadto wykazano, że związki obniżają ekspresję białek AKT i kinaz regulowanych zewnątrzkomórkowo – ERK1/ERK2. Najsilniejszy efekt we wszystkich przeprowadzonych zanotowano dla pochodnej OM-141.

Znakomitą większość wyników Autorka zebrała i przedstawiła w postaci tabelaryzowanych danych i rycin (7 tabel i 37 rycin), które wyczerpująco i przejrzysto dokumentują przeprowadzone analizy. Większość otrzymanych danych została poddana ocenie statystycznej, co w znacznym stopniu obiektywizuje otrzymane wyniki.

Uzyskane rezultaty zostały przeanalizowane w ramach wnikliwej dyskusji (str. 113-123), w której daje się zaobserwować dużą erudycję Doktorantki i Jej umiejętność samodzielnej, krytycznej oceny własnych wyników w konfrontacji z wynikami publikowanymi przez innych autorów. Całość dyskusji świadczy o dobrym, merytorycznym przygotowaniu Doktorantki. Wykazała się umiejętnością korzystania z najistotniejszych i najbardziej aktualnych danych literatury fachowej i zdolnością formułowania logicznych wniosków.

Praca jest napisana poprawnym językiem, ma bardzo staranną szatę graficzną. Studiując ją wnikliwie dostrzegłam tylko kilka niedociągnięć, na które zwracam uwagę z obowiązku recenzenta:

1. Opracowanie nie zostało zaopatrzone w listę skrótów;
2. W części Materiały i Metody nie zawarto informacji skąd pochodzą badane linie komórkowe nowotworowe oraz prawidłowe;
3. Na str. 38 zauważyłam nieścisłość dotyczącą ilości wyselekcjonowanych związków do dalszych badań - Doktorantka pisze o dziewięciu, chociaż dalej bada i podaje symbole tylko siedmiu pochodnych;

4. W kilku miejscach występują błędy edytorskie, jak np. na str. 125 zamiast aktywność jest „aktyw”;
5. Chętnie dowiedziałabym się także, dlaczego Doktorantka do substancji referencyjnych, czyli kamptotecyny i etopozyny nie dołączyła trabectedyny.

Wymienione drobne niedoskonałości i uwagi w żadnym razie nie umniejszają wartości merytorycznej pracy. Pracę oceniam wysoko, szczególnie za jej nowoczesny warsztat badawczy z zakresu biologii molekularnej i duży potencjał aplikacyjny w obszarze poszukiwania i opracowywania nowych terapii chorób nowotworowych.

Na tej podstawie zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Natalii Pawłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoki poziom, rangę rozwiązywanego problemu oraz jakość i zakres przeprowadzonych badań, a także fakt, iż Doktorantka opublikowała wyniki uzyskane w ramach dysertacji, w renomowanych czasopismach międzynarodowych o sumarycznym IF= 6.428 i jest pierwszym autorem jednej z nich składam także wniosek o wyróżnienie pracy.

Zakład Biochemii Farmaceutycznej (J.C.M.)


prof. dr hab. Elżbieta Pękala
kierownik