



Dr hab. Anna Krasowska
Zakład Biotransformacji
Wydział Biotechnologii
ul. F. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

Wrocław, 25.01.2018

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Malarz

pt. „*Chelatory metali w terapiach przeciwnowotworowych*”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Roberta Musioła

i dr Anny Mrozek-Wilczkiewicz

w Zakładzie Chemii Organicznej, Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii

Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

Celem rozprawy doktorskiej pani Katarzyny Malarz było poszukiwanie nowych chelatorów metali o właściwościach antyproliferacyjnych oraz wyjaśnienie molekularnego mechanizmu ich działania przeciwnowotworowego. Ponadto Autorka pracy przebadła ich aktywność jako adjuwantów w terapii kombinowanej ze stosowanymi fotouczulaczami w terapii fotodynamicznej. Otrzymane w pracy wyniki z całą pewnością pomogą w zrozumieniu mechanizmów działania pochodnych tiosemikarbazonu, co z kolei może przyczynić się do poznania nowych celów molekularnych w leczeniu nowotworów. Ponadto praca pani Katarzyny Malarz może doprowadzić do rozwoju innowacyjnych, wielokierunkowych terapii celowanych oraz do opracowania strategii racjonalnego projektowania nowych związków o lepszej aktywności przeciwnowotworowej i selektywności.

Ocena struktury pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 170 stron i ma następujący układ: rozpoczyna się krótkim opisem *Założeń i Celów* pracy, następnie Autorka zamieściła *Część Teoretyczną*, po czym przeszła do opisu *Badań Własnych*, które kończy rozdział *Podsumowanie*. Na końcu pracy znajduje się *Część Eksperymentalna*, która jest opisem

materiałów i metod użytych w rozprawie doktorskiej oraz *Literatura* zawierająca 371 pozycji. Układ pracy nie jest typowy dla prac eksperymentalnych, gdyż rozdział *Badania Własne* to skomasowanie wyników i dyskusji, *Podsumowanie* pełni rolę Streszczenia i nie ma Streszczenia w języku angielskim, które zazwyczaj zamieszczane jest w rozprawach doktorskich.

Ocena merytoryczna rozprawy

Założenia i Cele pracy obejmują cztery problemy naukowe: zbadanie przeciwproliferacyjnego działania nowo zsyntezowanych chelatorów metali, zbadanie ich mechanizmu działania, przebadanie ich zastosowania w terapii kombinowanej z fotouczulaczami oraz określenie synergizmu pomiędzy badanymi pochodnymi tiosemikarbazonu i fotouczulaczami z grupy chloryn.

Część teoretyczna obejmuje opis zagadnień koniecznych do zrozumienia założeń rozprawy i uzasadniających logiczność wykonywanych badań. W przystępny sposób omówiono znane do tej pory terapie celowane oraz coraz bardziej rozwijaną obecnie polifarmakologię, czyli projektowanie leków oddziałujących na wiele celów w komórce. Autorka opisała w wyczerpujący sposób rolę żelaza i miedzi w komórkach, metabolizm żelaza oraz biochemię miedzi. W dwóch ostatnich rozdziałach zostały opisane terapie oparte na wywołaniu stresu oksydacyjnego i znaczenie chelatorów żelaza w terapiach przeciwnowotworowych.

Rozdział **Badania Własne** rozpoczyna się wynikami z testów przeciwproliferacyjnych stu dziesięciu nowych pochodnych tiosemikarbazonu (TSC) wobec różnych typów komórek nowotworowych. Dużą aktywność przeciw proliferacji nowotworów jelita grubego linii HCT 116, typu dzikiego oraz komórek z nokautem genu TP53, nowotworów mózgu i piersi wykazywały pochodne TSC oparte na chinolinie, chinoksalinie, ketonie di-2-pirydylowym, pirydyno-2-karboksylaldehydzie, 3-aminopirydino-karboksylaldehydzie. Natomiast mniejszą aktywność lub jej brak wykazywały pochodne TSC oparte na 6-bromo-3-hydroksypirydynokarboksylaldehydzie, fenolu, 2-metoksyfenolu, fluorobenzenu, 1,3- i 1,4-difluorobenzenu czy nitrobenzenu. Przy czym nawet najbardziej aktywne przeciwnowotworowo związki były o wiele mniej toksyczne dla komórek prawidłowych, czyli fibroblastów. Do kolejnych etapów badań wybrano dziewięć najbardziej aktywnych związków, żeby wyjaśnić ich molekularny mechanizm działania.

W pierwszej kolejności Autorka pracy porównała aktywności związków stosując dwa różne czasy inkubacji: 72 i 96 godzin. Interpretując uzyskane wyniki stwierdziła, że poza dwoma wyjątkami, badane związki wykazują niewielki wzrost aktywności biologicznej po dłuższym czasie inkubacji. Skoro jednak dwa wyjątki wykazały po 96 godzinach 4,5 (pochodna MR5K3) oraz 5-krotnie (pochodna MR12K) wyższą aktywność niż po 72 godzinach inkubacji, to nie można określić jako „niewielką” aktywność pochodnej MR49 (4-krotnie wyższą) czy pochodnej MR50 (6-krotnie wyższą).

Doktorantka zaobserwowała, że znacznie spada aktywność przeciwproliferacyjna pochodnych TSC w obecności zewnętrznych źródeł jonów żelaza i miedzi. Jest to przesłanka do wyciągnięcia wniosku, iż jednym z możliwych mechanizmów działania badanych związków jest chelatowanie żelaza w komórkach nowotworowych HTC i MCF, charakteryzujących się zwiększonym poborem żelaza i dużą ilością białek IRP regulujących poziom tego pierwiastka w komórce. Należałoby rozważyć wykonanie doświadczeń z pomiarem ilości żelaza i miedzi w komórkach poddanych oddziaływaniu TSC, co dałoby być może bezpośrednią wskazówkę o rodzaju aktywności tych związków.

Ponieważ pochodne tiosemikarbazonu mogą generować reaktywne formy tlenu (ROS), Autorka pracy sprawdziła ich obecność w komórkach traktowanych TSC. Przy pomocy testu fluorescencyjnego została potwierdzona obecność ROS w komórkach nowotworów po działaniu TSC, a ich ilość korelowała z próbami z zastosowaniem wody utlenionej. Do niwelowania reaktywnych form tlenu służą w komórkach enzymy antyoksydacyjne katalaza i dysmutazy ponadtlenkowe oraz glutation. Uzyskane wyniki pokazały odwrotną zależność zmian poziomu ROS i stężenia wewnątrzkomórkowego glutationu pod wpływem badanych pochodnych TSC. Analiza ekspresji genów kodujących katalazę i manganową dysmutazę ponadtlenkową wykazała wzrost ekspresji genów po 12 godzinach hodowli z pochodnymi TSC, a następnie jej gwałtowny spadek po 24 godzinach. Nastąpiło więc wyczerpanie się obrony antyoksydacyjnej w komórkach. Zwiększona ilość ROS może wywołać apoptozę w komórkach nowotworowych. Autorka pracy stwierdziła także wzrost ekspresji genu *Ndr1* (odpowiedzialnego m.in. za wyzwolenie apoptozy) w komórkach poddanych działaniu TSC, co oznacza, że komórki te weszły w apoptotyczny szlak śmierci komórkowej. W dalszej części pracy Doktorantka skupiła się na ocenie ekspresji białek odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego. Pochodne TSC nie wpływały na aktywację białka p53, natomiast pojawił się wzrost ilości białka p21, wyniki te potwierdziły dane literaturowe o zwiększeniu ilości białka p21 za pośrednictwem genu *Ndr1* na drodze niezależnej od białka p53.

Doktorantka stwierdziła w dalszej części swojej pracy, że pochodne TSC wpływają na zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, co może kierować komórki na drogę apoptozy związaną z mitochondrialnym szlakiem sygnałowym.

Do badań nad synergistycznym działaniem TSC z fotouczulaczami wybrano dwa związki: MS168 oraz Dp44mT. Autorka pracy twierdzi, że były to najbardziej aktywne pochodne TSC. Szczególnie Dp44mT wydaje się idealnym kandydatem do badań nad terapią skojarzoną PDT. Analizując jednak wyniki badań można wylonić związki, które były bardziej aktywne w wielu aspektach niż wybrane struktury, tak więc Recenzentka jest ciekawa na jakiej tak naprawdę podstawie dwie pochodne TSC zostały wybrane do dalszych badań.

Otrzymane wyniki w tej części eksperymentalnej potwierdziły synergistyczne działanie związków TSC z fotouczulaczami w terapii fotodynamicznej.

Recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska może przyczynić się do rozpoczęcia kolejnej fazy badań, już w warunkach *in vivo*. Wielowątkowy mechanizm działania chelatorów żelaza predysponuje je do stosowania jako leków samodzielnych lub w połączeniach z innymi związkami w ramach terapii kombinowanych. Pewien niedosyt jednakże budzi brak w części pracy wyjaśniającej mechanizm działania pochodnych TSC doświadczeń wykonanych na komórkach zdrowych, co byłoby dodatkową informacją na przykład o ryzyku toksyczności badanych związków względem takich komórek.

Podczas czytania rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Malarz nasunęło mi się kilka pytań, np. jaka jest hipoteza wyjaśniająca oporność linii Hs683 na prawie wszystkie badane analogi związków (str. 55)? Na stronie 58 Autorka stwierdza, że związki z grupą etylową, propylową lub etylobenzenu oraz wodoru na terminalnym atomie azotu są nieaktywne wobec linii HCT i, że najprawdopodobniej przyczynia się do tego utrata cech kluczowych dla mechanizmu działania. Warto byłoby podyskutować w tym miejscu jakie cechy zostały utracone i jaki na to miały wpływ poszczególne podstawniki w strukturach związków. Jakie zachodzą zmiany w ekspresji genów związanych z obroną antyoksydacyjną i dlaczego są one typową odpowiedzią na działanie cytostatyków (str. 104)? To tylko parę przykładów pytań, wynikających z braku osobnego rozdziału Dyskusja. Połączenie omówienia wyników z dyskusją w recenzowanej pracy doktorskiej powoduje, że dyskusja jest mało wyczerpująca i pozostawia w czytelniku dużo wątpliwości.

Część Eksperymentalna to opis materiałów użytych do badań, takich jak linie komórkowe, odczynniki i aparatura oraz opis metod zawierający zarówno techniki badania cytotoxyczności testowanych związków, pomiary ilości białek, ekspresji genów, modulowanie cyklu

komórkowego, jak i oznaczanie niektórych produktów aktywności reaktywnych form tlenu, takich jak powstające w czasie peroksydacji lipidów TBR_{Sy}.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

Rozprawa została napisana poprawnym językiem polskim. Zdarzyły się jednak niezręczne sformułowania, takie jak na przykład nazwanie „czynnikiem” Ndr_{g1} bez określenia „gen” (str. 80), byłoby także lepiej nie używać określenia „rak głowy”, a pisać „rak mózgu” (str. 103) oraz nie można „utlenić wewnątrzkomórkowego poziomu glutationu” jak napisała Autorka pracy na str. 78. Nielicznie występują błędy, które potocznie nazywa się literówkami.

Podsumowanie recenzji

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Malarz pt.: „*Chelatory metali w terapiach przeciwnowotworowych*” stanowi oryginalne rozwiązanie problemów naukowych. Doktorantka w rozprawie wykazała się znajomością swojej tematyki badawczej, umiejętnością interpretacji i wyciągania wniosków z uzyskanych rezultatów. Wyniki otrzymane przez Doktorantkę otwierają dalsze perspektywy badawcze i aplikacyjne, a przedłożona praca doktorska potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Moja recenzja jest jak najbardziej pozytywna. Rekomenduję rozprawę doktorską mgr Katarzyny Malarz do wyróżnienia z powodu uzyskania przez Doktorantkę wyników, które umożliwiły rozpoznanie procesów zachodzących w komórkach nowotworowych pod wpływem pochodnych tiosemikarbazonu i wyjaśnienia mechanizmu działania tych związków, co umożliwi przeprowadzenie testów klinicznych i z dużym prawdopodobieństwem spowoduje ich zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie mgr Katarzyny Malarz do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie tej pracy doktorskiej.

Dr hab. Anna Krasowska