

Recenzja pracy doktorskiej mgra Michała Kuczaka pt. „*Badanie aktywności antyproliferacyjnej oraz mechanizmów działania pochodnych chinoliny w celu potencjalnego zastosowania w terapii przeciwnowotworowej*”

Jednym z głównych problemów współczesnej medycyny jest obserwowany wzrost oporności wielolekowej (MDR) na szereg substancji leczniczych, w tym na cytostatyki. Obecny stan wiedzy na temat chorób nowotworowych pozwala wnioskować, że do osiągnięcia całkowitego sukcesu terapeutycznego konieczne jest zastosowanie leków/terapii działających poprzez zróżnicowane mechanizmy, ukierunkowane na mikrośrodowisko guzów nowotworowych. Praca doktorska mgra Michała Kuczaka wpisuje się w ten nurt poszukiwań i dotyczy ważnego i interdyscyplinarnego kierunku badań jakim jest polifarmakologia. Jej założeniem jest poszukiwanie leków działających wielokierunkowo na różne punkty uchwytu (białka sygnałowe, enzymy czy receptory szlaków metabolicznych), dzięki czemu możliwe jest zwiększenie skuteczności zastosowanej terapii przy jednoczesnym ominięciu zjawiska lekooporności. Podjęta w ocenianej pracy doktorskiej tematyka badawcza mieści się w zakresie szeroko rozumianej chemii medycznej i jest rozwijana od kilku lat z bardzo interesującymi rezultatami w Instytucie Chemii Wydziału Nauk Ścisłych i Technicznych Uniwersytetu Śląskiego pod kierunkiem promotora niniejszej pracy prof. dr hab. Roberta Musioła. Przedstawiony do oceny materiał doświadczalny jest obszerny, a jego powstanie nie byłoby możliwe bez wieloletniej współpracy interdyscyplinarnych zespołów naukowych posiadających duże doświadczenie badawcze w różnych dziedzinach (t. j. chemia organiczna, biofizyka, biologia molekularna i farmakologia) i dysponujących zaawansowaną, specjalistyczną aparaturą naukową.

Rozprawa doktorska Pana mgr Michała Kuczaka stanowi spójne tematycznie 189 stronicowe opracowanie, które zostało napisane bardzo poprawnym językiem naukowym. Praca zawiera wszystkie wymagane rozdziały tj. wstęp, cel i zakres pracy, część teoretyczną (literaturową), część doświadczalną obejmującą badania własne, podsumowanie wyników i wnioski, opis materiałów i metod eksperymentalnych, oraz bibliografię. Kolejność rozdziałów w rozprawie i cytowane piśmiennictwo nie budzą zastrzeżeń recenzenta. Ponadto, rozprawa zawiera starannie przygotowane 42 rysunki i 24 tabele, które znacznie ułatwiają zrozumienie omawianych wyników. Po krótkim opisie zastosowanej analizy statystycznej został umieszczony szczegółowy wykaz stosowanych w pracy skrótów.



Piśmiennictwo liczy aż 414 odnośniki literaturowe, które zostały odpowiednio dobrane i odnoszą się do uznanych czasopism naukowych, Warto podkreślić, że Doktorant sięgnął bardzo wnikliwie do źródeł naukowych, często dość odległych czasowo, jak np. *JACS* z 1951 r, chociaż większość cytowanych prac opisuje osiągnięcia ostatnich kilkunastu lat. Wykorzystanie w pracy tak licznych pozycji literaturowych świadczy o swobodnym posługiwaniu się Doktoranta literaturą fachową oraz orientowaniu się w najnowszych osiągnięciach naukowych w tematyce, której dotyczy praca.

Doktorant na końcu dysertacji zawarł kilka ważnych informacji dotyczących osiągnięć naukowych. Dowiadujemy się zatem, że jest współautorem aż 11 artykułów opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach naukowych (*J. Hazard Mater.*, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, *Cancers*, *Int. J. Mol. Sci.*, *Eur. J. Med. Chem.*, *Nanomaterials*, *Bioorg. Chem.*), a także 8 komunikatów konferencyjnych. Biorąc pod uwagę najbardziej aktualne wartości współczynników oddziaływania czasopism, Doktorant może pochwalić się imponującym wynikiem (sumaryczny IF_{2021} tych prac wynosi 86,969). Biorąc pod uwagę wiek Doktoranta oraz etap rozwoju kariery naukowej przytoczane dane uważam za wyróżniające. Ze swojej strony mogę pogratulować Autorowi i życzyć, aby nie zwalniał tempa, kontynuował prowadzenie badań na tak wysokim poziomie, a z pewnością niebawem znajdzie się w gronie wybitnych młodych naukowców.

Przedstawione przez Autora cele pracy doktorskiej zostały jasno i poprawnie sformułowane i są adekwatne do podjętego tematu rozprawy. Główną koncepcją pracy jest zbadanie aktywności nowych pochodnych styrylochinoliny oraz furanylwinylochinoliny wobec wybranych komórek nowotworowych o różnym pochodzeniu (glejaki, nowotwór jelita grubego i trzustki) i ekspresji białka p53. Ponadto celem przeprowadzonych badań była próba wyjaśnienia mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za ich aktywność antyproliferacyjną (m. in. określenie rodzaju śmierci komórkowej oraz poziomu ROS i wybranych antyoksydantów). Dodatkowo, w celu określenia selektywności badanych związków wobec komórek nowotworowych, przeprowadzono testy cytotoksyczności na komórkach prawidłowych (ludzkich fibroblastach).

W części literaturowej Autor przedstawia aktualny stan wiedzy na temat właściwości biologicznych pochodnych chinoliny. Omówione są tu między innymi problemy związane z projektowaniem nowych leków należących do tej grupy związków, oceną ich aktywności biologicznej i możliwościami potencjalnych aplikacji. Dodatkowo, na podstawie wnikliwego przeglądu literaturowego, Autor zebrał szereg istotnych i ciekawych informacji na temat aktualnych trendów chemii medycznej.



Następnie Pan mgr Michał Kuczak opisał molekularne podstawy przebiegu cyklu komórkowego oraz apoptozy podczas procesu nowotworzenia, zwracając uwagę na funkcje najistotniejszych białek odgrywających kluczową rolę w obu procesach. Z oczywistych względów najobszerniej zostało omówione białko p53 będące głównym czynnikiem transkrypcyjnym o własnościach supresora nowotworowego. Pozostałe podrozdziały dotyczą problematyki szeroko rozumianej homeostazy redoksowej ze szczególnym uwzględnieniem wpływu glukozy, tlenu oraz reaktywnych form tlenu obecnych w komórkach nowotworowych na procesy progresji nowotworów. Równoległe zagadnienia z tym związane (glikoliza, hipoksja, stres oksydacyjny) zostały omówione w kontekście projektowania nowych leków i strategii przeciwnowotworowych. Część literaturową kończy krótkie omówienie aktywności biologicznej i mechanizmów działania związków chemicznych projektowanych w celu przywrócenia prawidłowych funkcji zmutowanego białka p53.

Uważam, że wstęp literaturowy jest świadectwem dobrego przygotowania teoretycznego Doktoranta do realizacji zróżnicowanych badań. Materiał ten został opracowany w sposób zwięzły i zrozumiały i zawiera jedynie drobne nieścisłości. Na stronie 18 Doktorant niepoprawnie zalicza tlen singletowy do form wolnorodnikowych, podczas gdy jest to jedna ze wzbudzonych form tlenu cząsteczkowego. Podczas obrony chciałbym dowiedzieć się od Doktoranta jakie są różnice między reaktywnością wolnych rodników tlenowych i tlenu singletowego i czy istnieją metody pozwalające na selektywną detekcję różnego rodzaju ROS zarówno w roztworach jak i w układach biologicznych *in vitro*. Jestem też ciekawy czy Doktorant dysponuje wiedzą na temat metod monitorowania hipoksji nie tylko w komórkach, ale też *in vivo* w guzach nowotworowych.

Rozdział 10 zawiera to najbardziej obszerna część pracy obejmujący interpretację wyników doświadczalnych. Lektura tej części i analiza opisanych w pracy wyników zajęła recenzentowi najwięcej czasu, dlatego też jestem pełen uznania dla ogromu pracy jaką włożył Doktorant w ich otrzymanie, staranne zestawienie i omówienie. Na początku została omówiona aktywność antyproliferacyjna 82 związków będących pochodnymi styrylochinoliny wobec dwóch sublinii komórek HCT 116. Dla wszystkich przebadanych z tej grupy związków Autor wyznaczył wartości stężenia powodującego zahamowanie aktywności metabolicznej u 50 % populacji komórek (IC_{50}), a następnie dokonał szczegółowej analizy zależności struktura-aktywność. Doktorant brał pod uwagę między innymi takie aspekty strukturalne jak acetylowanie grupy hydroksylowej w pierścieniu fenyłowym, wprowadzenie atomów halogenów, lokalizację podstawnika styrylowego czy nitrowanie grupy fenyłowej tegoż



podstawnika. W analizach zależności struktury z aktywnością, zostało stwierdzone między innymi, że: i) substytucja grupy metoksylowej w pozycję *meta* podstawnika styrylowego z reguły poprawia aktywność przeciwnowotworową; ii) podstawienie pierścienia fenyloвого grupą etoksylową wręcz przeciwnie - zmniejsza ich aktywność; iii) bardziej aktywnym okazał się związek, w którym acetylowaniu poddano grupę hydroksylową w pierścieniu fenylowym, iv) pochodna z grupą acetyloksylową w pozycji *para* nie wykazywała aktywności antyproliferacyjnej; v) halogenowanie z reguły nie prowadziło to znacznego zwiększenia cytotoksyczności (efekt zależał od rodzaju halogenu i pozycji do której został przyłączony); v) nitrowanie grupy fenylowej podstawnika styrylowego znacznie zwiększało aktywność przeciwnowotworową.

Z przebadanej biblioteki związków wyselekcjonowano dziesięć najbardziej aktywnych i selektywnych pochodnych, które następnie przebadano na bardziej opornych i agresywnych komórkach nowotworowych, tj. komórki glejaka U-251 komórki nowotworów trzustki PANC 1 oraz AsPC-1.

Do ciekawszych wniosków wyciągniętych przez Autora pracy, należy zaliczyć spostrzeżenie, że największą aktywność wykazywały pochodne z podstawnikiem dołączonym do węgla C2 w pozycji *orto* oraz te z przyłączonymi podstawnikami nitrylowymi i nitrowymi oraz wskazanie, iż zdolność do chelatowania jonów metali przez pochodne 8-hydroksychinoliny prowadzi do generowania wolnych rodników, co skutkuje wywołaniem stresu oksydacyjnego i skierowaniem komórek na drogę apoptozy. Zagadnienia te były badane przez Doktoranta w dalszej części pracy. Otrzymane wyniki potwierdziły, iż badane związki prowadziły do wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowych ROS, co z kolei skutkowało zmniejszeniem się ilości zredukowanej formy glutationu, w efekcie czego następowało zaburzenie równowagi redox komórek i ich skierowanie na ścieżkę apoptozy.

Szkoda, że pomiary spektrofluorymetryczne z zastosowaniem odczynnika CellROX Green były jedyną metodą wyznaczenia z ilości ROS. Być może warto też przemyśleć rozszerzenie tych badań o bardziej ilościowe pomiary konkretnych form rodnikowych tudzież innych typów ROS i tym samym pokuszenie się o bardziej szczegółową analizę mechanizmów molekularnych.

Przedstawione w pracy badania można uznać za dość rutynowe, jednak dzięki przedstawionej w ten sposób analizie zależności struktura-aktywność, możliwe było zaprojektowanie nowej biblioteki związków o potencjalnie większej aktywności przeciwnowotworowej. Kolejna część pracy dotyczyła zatem oceny aktywności antyproliferacyjnej 8 a w zasadzie 9 pochodnych furanylwinylocholinoliny. Przy takiej ilości badanych związków, osobiście pokusiłbym się o dodatkowy eksperyment, który pozwoliłby na określenie faktycznej ilości badanych związków w komórkach, a następnie porównanie uzyskanych



danych z aktywnością antyproliferacyjną. Chciałbym się dowiedzieć, jakie ma Doktorant pomysły na przeprowadzenie eksperymentów pozwalających na zbadanie lokalizacji komórkowej i ilościowe określenie stężenia badanych związków w komórkach. Bardzo ciekawe byłoby również uzupełnienie tych badań o określenie zależności przeżywalności komórkowej w zależności od ilości związków w komórkach w warunkach hipoksji i normoksji. To z kolei można by skorelować z mechanizmami generowania różnych ROS *in vitro*.

W rozdziale „Materiały i metody eksperymentalne” znajduje się spis stosowanych odczynników, krótka charakterystyka sprzętu laboratoryjnego oraz opis stosowanych hodowli komórkowych doświadczeń przeprowadzonych *in vitro*. W części poświęconej metodyce badań biologicznych, Doktorant opisuje stosowane przez Niego testy do określania aktywności antyproliferacyjnych badanych pochodnych, oceny ich wpływu na generowanie ROS, indukcję apoptozy, ekspresję białek związanych z wybranymi szlakami metabolicznymi itd. Uważam, że opis stosowanych materiałów i metod spełnia swoją zasadniczą rolę, ponieważ zawiera niezbędne informacje umożliwiające odtworzenie warunków badań przez niezależnych badaczy.

Do najważniejszych osiągnięć uzyskanych przez mgra Michała Kuczaka zaliczam:

- Zbadanie aktywności antyproliferacyjnej 91 nowych związków z grupy chinoliny względem dwóch sublinii komórek nowotworu jelita grubego, a dla 10 najbardziej obiecujących związków również względem komórek glejaka i nowotworów trzustki.
- Przeprowadzenie skrupulatnej analizy zależności struktura-aktywność biblioteki badanych związków oraz określenie profilu selektywności działania związków z potwierdzoną aktywnością biologiczną.
- Zaproponowanie mechanizmu działania badanych związków, u którego podstaw leży wywołanie stresu oksydacyjnego poprzez efektywne generowanie ROS, co w konsekwencji prowadzi do skierowanie komórek na ścieżkę apoptozy.

Uważam, że zaprezentowana w pracy wnikliwa analiza aktywności 91 nowych związków z uwzględnieniem korelacji struktura-aktywność w zupełności wystarczyłaby do nadania stopnia doktora. Jednak dodatkowe badania biologiczne wykonane przy pomocy zaawansowanych narzędzi biologii molekularnej pozwalają Autorowi spojrzeć w szerszy sposób na problematykę pracy i w istotny sposób wzbogacają przedstawioną do oceny dysertację.



Na wyróżnienie zasługuje fakt, iż wyniki badań wchodzących w zakres rozprawy opublikowano w postaci 11 pełnotekstowych artykułów w bardzo dobrych czasopismach naukowych specjalizujących się w publikacji interdyscyplinarnych wyników badań (*J. Hazard Mater.*, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, *Cancers*, *Int. J. Mol. Sci.*, *Eur. J. Med. Chem.*, *Nanomaterials*, *Bioorg. Chem.*). Warto dodać, że publikacja w *Bioorg. Chem.* ściśle związana z tematyką doktoratu: „*Synthesis of 8-hydroxyquinoline glycoconjugates and preliminary assay of their β 1, 4-GalT inhibitory and anti-cancer properties*”, była już cytowana 38 razy.

Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa prezentuje wysoki poziom badań i zawiera elementy nowości naukowej. Na podkreślenie zasługuje umiejętność wykorzystania zdobytej wiedzy teoretycznej do praktycznego rozwiązywania skomplikowanych problemów naukowych w zakresie interdyscyplinarnej tematyki. Doktorant wykazał się znajomością licznych technik badawczych, a co najważniejsze pracowitością i starannością w prowadzeniu badań. Większość zarzutów, które podniosłem w niniejszej recenzji należy traktować jako zaproszenie do dyskusji podczas obrony doktorskiej, nie zaś jako istotne błędy merytoryczne wpływające na końcową bardzo dobrą ocenę dysertacji. Uważam, że jest to wartościowa praca, zawierająca obszerny materiał doświadczalny o niewątpliwej wartości naukowej, który w przyszłości być może znajdzie zastosowanie praktyczne. Praca od strony językowej i redakcyjnej jest również bardzo dobrze przygotowana i jej lektura była dla mnie prawdziwą przyjemnością.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) oraz art.179 ustawy z dn. 3 lipca 2018 r. i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego o dopuszczenie Pana mgra Michała Kuczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę nowatorski charakter pracy, jej interdyscyplinarność, niekwestionowaną wartość naukową i oryginalność potwierdzoną publikacjami w bardzo dobrych czasopismach naukowych, z pełnym przekonaniem wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Dr hab. Janusz M. Dąbrowski, prof. UJ