

Łódź, dn. 24.08.2023

Prof. dr hab. n. med. Ewa Brzezińska-Lasota

Zakład Biomedycyny i Genetyki

Katedra Biologii i Mikrobiologii Medycznej UM w Łodzi

Ocena

pracy doktorskiej mgr Karola Bukowskiego

„Aktywność przeciwnowotworowa nowych trójcyklicznych pochodnych układu pirazolo[4,3-e][1,5-b][1,2,4]triazyny w komórkach linii nowotworowych człowieka”

Praca doktorska wykonana w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Genetyki, Instytutu Biologii Eksperymentalnej

Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ

Promotor

dr hab. Renata Kontek, prof. UŁ

Promotor pomocniczy:

Dr Beata Marciniak

Wraz ze zmianami środowiskowymi i szybkim tempem rozwoju cywilizacyjnego, dynamicznie wzrasta częstotliwość występowania chorób nowotworowych, a w wielu przypadkach stosowane leczenie nie jest zadowalające, co za tym idzie, nie obserwuje się wydłużenia czasu przeżycia pacjentów. Obecnie, powszechne stosowanie chemioterapii z użyciem taksanów (docetaksel, paklitaksel) w leczeniu raka jajnika, piersi, czy niedrobnokomórkowego raka płuca jak i chemioterapii opartej na oksaliplatynie stosowanej w leczeniu raka jelita grubego, raka trzustki czy żołądka, wiąże się z występowaniem wielu skutków ubocznych leczenia, wpływających niekorzystnie na jakość życia pacjentów onkologicznych. Dlatego też, na całym świecie prowadzone są intensywne badania, mające na celu znalezienie nowych leków chemoprewencyjnych i przeciwnowotworowych, które mogłyby być wykorzystane w monoterapii jak i w skojarzeniu z innymi metodami leczenia onkologicznego.

Przeprowadzone badania na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat wykazały, że godną uwagi grupą związków chemicznych są pochodne triazyny, które obecnie testuje się na różnych modelach *in vitro* i *in vivo* oraz przeprowadzane są badania kliniczne. Wzrost zainteresowania tą grupą związków wynika z udowodnionej w badaniach ich wszechstronnej aktywności biologicznej, która wiąże się z różnymi mechanizmami ich fazowego działania w komórkach. Wykazano, że cechują się one różną toksycznością w stosunku do komórek, jak i selektywnością działania na określony typ nowotworu. Niedawne doniesienia potwierdzają, że pochodne triazyny oddziałują na kinazy zależne od cyklin, hamują anhidrazy węglanowe, czy wpływają na aktywność wielu szlaków komórkowych m.in. szlaków: Wnt/ β -kateniny, Hedgehoga, mTOR, czy RAS-RAF-MAPK. Modulowanie ich ekspresji pod wpływem modyfikowanych struktur triazyny wydaje się więc mieć istotne znaczenie w hamowaniu rozwoju procesu nowotworowego. W oparciu o powyższe dane sugeruje się, że pochodne triazyny mogą stać się innowacyjnym celem terapeutycznym w chorobach nowotworowych.

W powyższy obszar badań wpisuje się przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Karola Bukowskiego, w której podjęto się analizy właściwości przeciwnowotworowych nowych pochodnych pirazolo-triazyny: MM129, MM130 i MM131.

W pracy badawczej zaplanowano badania cytotoksyczności nowych związków, które przeprowadzono na komórkach linii nowotworowych człowieka: raka szyjki macicy (HeLa), raka okrężnicy (HCT 116), raka prostaty (PC-3) oraz gruczolakoraka trzustki (BxPC-3). Uwzględniono także model komórek prawidłowych: linię ludzkich fibroblastów napletka (linia Hs-27) oraz jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka (ang. Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs). W pracy dokonano także oceny stopnia genotoksyczności związków MM129, MM130 i MM131 oraz poziomu działania prooksydacyjnego i proapoptotycznego badanych związków. Dokonano analizy przebiegu cyklu komórkowego oraz jego poszczególnych faz po ekspozycji komórek na badane związki. W badaniach *in silico* przeprowadzono ocenę wiązania się badanych związków do kinaz zależnych od cyklin (ang. Cyclin-dependent kinases, CDKs) oraz stabilności ww. kompleksów.

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Karola Bukowskiego jest wynikiem wielodyscyplinarnych badań realizowanych we współpracy z Katedrą Chemii, Instytutu Nauk Chemicznych, Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach, oraz przy współpracy Chitkara College of Pharmacy, Chitkara University, Rajpura, Punjab, Indie.

Na dysertację mgr Karola Bukowskiego składa się cykl trzech prac spójnych tematycznie, w skład których wchodzi jedna publikacja przeglądowa oraz dwie prace naukowe oryginalne, napisane w języku angielskim i opublikowane w recenzowanych pismach o

zasięgu międzynarodowym. Wszystkie artykuły naukowe są opracowaniami zbiorowymi, gdzie Doktorant jest pierwszym autorem pracy, a jego udział w powstaniu tych prac był znaczący (60-70%), co świadczy o samodzielności badawczej Doktoranta. Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania (IF) publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 17,058 (420 punktów MEiN).

Przedłożona do oceny dysertacja ma **typowy układ**. Zasadnicze części rozprawy to spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (str. 6), wprowadzenie (str. 7), cel pracy (str. 10), materiał i metody badawcze (str. 12), omówienie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (str.15), wnioski (str. 28), literatura uzupełniająca (str. 30), streszczenie w języku polskim (str. 33) i angielskim (str. 32). oraz dorobek naukowy Doktoranta (str. 37). Literatura uzupełniająca liczy 30 pozycji anglojęzycznych, aktualnych, prawidłowo tematycznie dobranych dla przedstawionego w dysertacji problemu badawczego.

Rozprawa zawiera informacje o źródle finansowania, a także oświadczenia o udziale w powstawaniu publikacji Doktoranta oraz pozostałych współautorów. W mojej ocenie rozprawa **spełnia pod względem formalnym wymogi ustawowe**.

W części wprowadzenie, Doktorant przedstawia aktualne, globalne dane epidemiologiczne dotyczące przypadków zachorowania na choroby nowotworowe i częstości zgonów z powodu różnych typów nowotworów u kobiet i mężczyzn. Wskazuje na główne czynniki ryzyka zachorowania na choroby nowotworowe. Charakteryzuje grupy powszechnie stosowanych leków przeciwnowotworowych i mechanizm ich działania, ze szczególnym uwzględnieniem grupy związków monocyklicznych, pochodnych (1,2,4)-triazyny. Charakteryzuje tematykę prezentowanej rozprawy doktorskiej. W dalszej części Doktorant przedstawił **cele pracy**, gdzie celem głównym była analiza w warunkach *in vitro* profilu aktywności przeciwnowotworowej zsyntetyzowanych *de novo* pochodnych pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[1,5-*b*][1,2,4]triazyny: MM129, MM130 i MM131 jak i wytypowanie związku o najwyższej aktywności onkoterapeutycznej. Doktorant przedstawił hipotezę badawczą, gdzie założył, że nowo zsyntetyzowane pochodne układu pirazolo-triazyny będą 1. hamowały proliferację badanych komórek linii nowotworowych człowieka poprzez indukcję uszkodzeń DNA, zahamowanie replikacji i podziałów komórkowych, 2. indukowały śmierć komórek nowotworowych na drodze apoptozy, oraz 3. generowały stres oksydacyjny w komórkach nowotworowych. W części **materiał i metody** Doktorant scharakteryzował linie komórkowe zastosowane w eksperymencie z uwzględnieniem kontroli negatywnej dla tych linii oraz metody stosowane w analizie cytotoksyczności badanych związków (test MTT), poziomu uszkodzeń DNA (test kometowy), genotoksyczności (immunocytochemiczne wykrywanie histonu γ -H2AX), analizie poziomu reaktywnych form tlenu (metoda fluorescencyjna z sondą diocetanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCF-DA) oraz w analizie zmian apoptotycznych

(barwienie aneksyną V wyznakowaną izotiocyanianem fluoresceiny). Zastosowany w pracy szeroki wachlarz metod badawczych z zakresu biologii komórki, świadczy o dobrym przygotowaniu Doktoranta do pracy eksperymentalnej, gdzie metody hodowli komórkowej, metoda cytometrii przepływowej (ocena apoptozy i cyklu komórkowego) jak i metoda fluorescencyjnego obrazowania; zliczania ognisk histonu γ -H2AX w obrazach mikroskopowych (ocena dwuniciowych pęknięć DNA), wymaga sporego doświadczenia. W części dotyczącej omówienia prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, otrzymane wyniki badań Doktorant przedyskutował w odniesieniu do danych literaturowych.

Ocena merytoryczna

Przedstawiona do oceny rozprawa składa się z opublikowanych i wcześniej już recenzowanych naukowych artykułów. Cykl publikacji wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej otwiera publikacja przeglądowa pt. „Multidrug resistance in Cancer Chemotherapy”, (opublikowana w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* 2020, 21, 3233.). W artykule tym został opisany podstawowy podział chemioterapeutyków ze względu na ich mechanizm działania oraz omówiono molekularne podłoże mechanizmów związanych z lekoopornością (ang. Multidrug Resistance MDR) komórek nowotworowych. Doktorant podjął się charakterystyki szczególnie ważnego zagadnienia z punktu widzenia praktycznego, ze względu na fakt, że lekooporność rozwijająca się u pacjentów onkologicznych podczas chemioterapii stanowi poważny problem medyczny związany z niepowodzeniem terapii. Znajomość molekularnych mechanizmów lekooporności jak i opracowania naukowego tego zagadnienia wspomogą rozwój badań nad opracowaniem nowych strategii terapeutycznych, w tym terapii celowanych molekularnie.

Kolejna publikacja składająca się na cykl rozprawy doktorskiej to praca oryginalna pt. „Pyrazolo[4,3-e]tetrazolo[1,5-b][1,2,4]triazine Sulfonamides as Novel Potential Anticancer Agents: Cytotoxic and Genotoxic Activities In Vitro.” (opublikowana w czasopiśmie *Molecules* 2022, 27, 3761). W publikacji tej zostały przedstawione wyniki badań dotyczące cyto- oraz genotoksyczności nowo zsyntetyzowanych związków pochodnych triazyny (MM129, MM130 i MM131) wobec ludzkich komórek linii nowotworowych (HeLa, HCT 116, PC-3 oraz BxPC-3), gdzie Doktorant wykazał silne, zróżnicowane - zależnie od typu komórek - właściwości przeciwnowotworowych badanych związków. Ważnym wynikiem pracy było udowodnienie, że komórki nowotworowe są wrażliwe na badane związki w bardzo niskim zakresie stężeń oraz, że komórki prawidłowe wykazują kilkukrotnie niższą wrażliwość. Jest to istotny wynik z punktu widzenia zagadnień farmakologii, biodostępności leku jak i jego toksyczności. Dodatkowo, bardzo ważnym - z punktu widzenia praktyki klinicznej - wynikiem powyższych badań była obserwacja, że analizowane związki wykazują znacznie silniejszą cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotworowych w porównaniu z obecnie stosowanymi onkoterapeutykami: jak 5-

fluorouracyl, cisplatyna oksaliplatyna, jak i irinotekan. Doktorant zaobserwował także różnice w stopniu cyto- i genotoksyczności badanych związków; silniejszą toksyczność dla MM130 i MM131 w porównaniu z MM129, co Autor połączył z różnicami w strukturze chemicznej. Wyniki te zachęcają do dalszych badań nad pochodnymi pirazolo-triazyny w aspekcie ich wykorzystania klinicznego w terapii onkologicznej.

Cykl publikacji zamyka kolejna praca oryginalna pt. „Pyrazolo[4,3-e]tetrazolo[1,5-b][1,2,4]triazine Sulfonamides as Novel Potential Anticancer Agents: Apoptosis, Oxidative Stress, and Cell Cycle Analysis” (opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24, 8504). W pracy tej Doktorant ocenił zdolność badanych związków do indukcji apoptozy, stresu oksydacyjnego oraz do inicjowania zaburzeń w przebiegu cyklu komórkowego. Doktorant wykazał, że spośród testowanych związków najwyższy potencjał proapoptotyczny wykazał związek MM129. W dalszej kolejności Doktorant ocenił właściwości prooksydacyjne badanych pochodnych pirazolo-triazyny, gdzie udowodnił, że wszystkie badane związki indukowały, zależny od stężenia, wzrost reaktywnych form tlenu (RFT) we wszystkich badanych typach komórek nowotworowych. Potwierdził tym samym wysoką aktywność prooksydacyjną badanych związków. Istotnym z punktu widzenia praktycznego wynikiem badań Doktoranta jest potwierdzenie, że wśród pochodnych pirazolo-triazyny-związek MM131 ma najsilniejsze działanie: geno-, cytotoksyczne jak i prooksydacyjne w stosunku do komórek nowotworowych. Kolejnym istotnym wynikiem badań Doktoranta była obserwacja, że badane związki (MM129, MM130 i MM131) mają zróżnicowany wpływ na przebieg cyklu komórkowego i jego poszczególne fazy, zależnie od rodzaju linii komórek nowotworowych. Wyniki te stanowią przesłankę do możliwego ich zastosowania w leczeniu systemowym, gdzie stosuje się leki skutecznie działające w różnych fazach podziału komórki. Zwieńczeniem badań Doktoranta była przeprowadzona analiza *in silico* dokowania molekularnego, która udowodniła, że pochodne pirazolo-triazyny mają wysoki potencjał wiązania się z kinazami zależnymi od cyklin (CDKs), a w szczególności związek MM129.

Podsumowując, za najważniejsze osiągnięcia pracy badawczej Doktoranta, składające się na cykl przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej należy uznać udowodnienie w modelu *in vitro*:

1. Wysokiego potencjału genotoksycznego, prooksydacyjnego i proapoptotycznego pochodnych pirazolo-triazyny w stosunku do komórek linii nowotworowych zastosowanych w doświadczeniach (zróżnicowanego - zależnie od typu komórek nowotworowych), w odniesieniu do linii komórek prawidłowych,
2. Występowania zróżnicowanych mechanizmów w jakich badane związki oddziałują na komórki nowotworowe, takich jak: indukcja podwójnych pęknięć

DNA (gdzie komórki linii nowotworowej HCT 116 były najbardziej wrażliwe), mechanizmy proapoptotyczne (w komórkach HeLa i HCT 116), zróżnicowany wpływ na przebieg cyklu komórkowego i jego poszczególne fazy czy generowanie nadmiernej syntezy RFT, co ma związek z aktywacją apoptozy w komórkach nowotworowych .

dodatkowo

3. Przeprowadzona przez Doktoranta analiza *in silico* dokowania molekularnego wykazała zdolność badanych pochodnych pirazolo-triazyny do hamowania kinaz zależnych od cyklin (CDKs). Jest to bardzo istotny wynik, z uwagi na fakt, że zmiany ekspresji cyklin oraz kinaz zależnych od cyklin mają udowodnioną kluczową rolę w procesie nowotworzenia.

Z obowiązku Recenzenta pragnę jednak zwrócić uwagę, że wniosek Doktoranta dotyczący **silnego potencjału onkoterapeutycznego** badanych związków w stosunku do układu badawczego *in vitro* jest trochę zbyt daleko idący. Mógłby być jednoznacznie odniesiony w stosunku do wyników badań *in vivo* w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym określonym typem nowotworu w oparciu o badania kliniczne. Jest to związane z faktem, że około 90% badanych związków kandydackich syntetyzowanych *de novo*, nigdy nie zostaje zatwierdzonych jako lek, z uwagi na negatywny rezultat prób klinicznych, pomimo udowodnionej skuteczności i bezpieczeństwa w modelach *in vivo* czy na modelach zwierzęcych. Pragnę także zaznaczyć, że zastosowanie wykazu skrótów w przedstawionej rozprawie doktorskiej, znacznie ułatwiłoby czytanie pracy.

Proszę również Doktoranta o ustosunkowanie się do kilku kwestii:

1. W publikacjach w części metodycznej zaznaczono regularne sprawdzanie hodowli komórek pod kątem zakażenia. Proszę o sprecyzowanie jakie działania prewencyjne zostały zastosowane w Pana pracy żeby uniknąć zakażeniu hodowli mykoplazmą oraz jaki zakres badań był prowadzony w celu sprawdzenia czy hodowla nie jest zakażona?
2. Proszę o doprecyzowanie czy w teście MTT do oceny cytotoksyczności badanych związków zastosowano suplementowanie FBS a jeśli tak, to jaki wpływ miałyby suplementacja na żywotności i status proliferacyjny badanych komórek ?
3. Proszę o doprecyzowanie czym sugerował się Pan przy wyborze czasu 72 h inkubacji komórek w ocenie cytotoksyczności badanych związków ?

4. Jak zinterpretowałby Pan różnice w otrzymanych wynikach żywotności komórek z testu 4.4. Cytotoxicity—MTT Assay (publikacja 2), w którym po zastosowaniu inkubacji 72h np. ze związkiem MM129 o stężeniu 0,36μM uzyskał Pan 50% żywych komórek linii PC-3, oraz w analizie zmian apoptotycznych 2.1. Flow Cytometry Assessment of Annexin V Binding (publikacja 3- wynik w suplementach) dla tej samej linii komórkowej i inkubacji 72h z tym samym związkiem o takim samym stężeniu uzyskał Pan 23,5% żywych komórek." ?

Wniosek końcowy

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska, na którą składa się cykl trzech publikacji oraz wprowadzająca część opisowa jest syntetycznym i rzeczowym opracowaniem. Doktorant bardzo merytorycznie przeprowadził dyskusję swoich wyników w konfrontacji o dane literaturowe. Realizacja założonych w pracy celów wymagała od Doktoranta bardzo dobrego przygotowania merytorycznego i praktycznego, na co wskazują zastosowane metody badawcze i jakość otrzymanych wyników. Każda z prac wchodzących w skład cyklu, została oceniona przez niezależnych recenzentów i opublikowana w wysoko punktowanych czasopismach o wysokim wskaźniku wpływu. Opublikowane przez Doktoranta prace badawcze wnoszą ważny wkład w rozwój nauk biologicznych jak i niewątpliwie będą podstawą w tworzeniu nowych celów terapeutycznych dla niektórych typów nowotworów u ludzi.

Stwierdzam, że Doktorant całkowicie zrealizował założone w pracy cele badawcze a rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1668).

Z prawdziwą przyjemnością przedkładam Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w Dyscyplinie Nauki Biologiczne wniosek o dopuszczenie mgr Karola Bukowskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej.

Ze względu na wielopłaszczyznowe i interdyscyplinarne badania, wysoką wartość poznawczą jak i wyróżniający się poziom merytoryczny przeprowadzonej dysertacji, oraz przyszłe znaczenie praktyczne otrzymanych wyników badań, wnioskuję także o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. n. med. Ewa Brzezińska-Lasota



