

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
LEK. WET. TOMASZA GĘBAROWSKIEGO

TYTUŁ PRACY

„MECHANIZMY DZIAŁANIA PRZECIWNOWOTWOROWEGO
NOWYCH POCHODNYCH OLIWACYNY.”

W przedstawionej do recenzji pracy Doktorant podjął się zbadania *in vitro* efektów farmakodynamicznych 14 syntetycznych związków pirydokarbazoli będących pochodnymi oliwacyny. Oliwacyna i eliptycyna są alkaloidami o podobnej strukturze cząsteczki należącymi do grupy pirydokarbazoli, izolowanymi z roślin (*Aspidosperma olivaceum*, *Ochrosia elliptica* Labill., *Strychnos dinklagei* Gilg), które wykazały działania przeciwpierwotniakowe, antybiotyczne i przeciwnowotworowe zbliżone do innych substancji alkilujących stosowanych w praktyce klinicznej.

Zostały przeprowadzone i podsumowane badania na hodowlach linii komórkowych określające wpływ badanych cząsteczek na proliferację, apoptozę, genotoksyczność, aktywność topoizomery II i syntezę wybranych białek mających związek z wielolekową opornością nowotworów.

Autor pracy zakłada, że przeprowadzone badania będą podstawą wyznaczenia cząsteczek, których dalszy rozwój może doprowadzić do opracowania nowego leku przeciwnowotworowego o pożądanej skuteczności, bezpieczeństwie i niepoddającym się lekooporności.

Naukowe zainteresowanie eliptycyzną i jej pochodnymi od roku 1966 ilustruje rosnąca liczba publikacji, która osiągnęła szczyt 30 doniesień w roku 1990, a obecnie liczba ta zmalała do 17 w 2016 roku. Znacznie mniejsze zainteresowanie dotyczy oliwacyny, obejmując 45 publikacji w latach 1983-2014. Aczkolwiek rosnąca w ostatnich 2 latach liczba publikacji wskazuje choroby nowotworowe i zaburzenia neurologiczne jako kierunki rozwoju pochodnych oliwacyny [PubMed, PubChem].

Uważam więc, że wybór pochodnych oliwacyny jako przedmiotu badań wynika z uzasadnionej potrzeby poszerzenia wiedzy naukowej dotyczącej tych związków, choć Autor nie przedstawił tego dosłownie.

Z powyższego powodu uważam pracę za nowatorską.

Za cel główny Doktorant obrał analizę parametrów farmakodynamicznych, które należą do przyjętego na świecie panelu badań przedklinicznych cząsteczek, które potencjalnie mogą stanowić substancje czynne leków przeciwnowotworowych.

Praca ma typowy układ edytorski, liczy 128 stron, składa się z 9 rozdziałów, jest ilustrowana 18 rycinami, 32 tabelami i 4 mikrofotografiami umieszczonymi i omówionymi w tekście, ponadto 12 rycinami zebranych w suplemencie. Piśmiennictwo, obejmujące 128 pozycji z lat 1959-2016, zawiera najważniejsze publikacje historyczne oraz 19 pozycji wydanych w ostatnich 5 latach związanych z omawianym tematem. Autor powołuje się również na autorów polskich (14 pozycji). Piśmiennictwo jest właściwie dobrane i cytowane.

Wstęp pracy jest bardzo syntetyczny i zawiera zwięzłe informacje stanowiące podstawy zrozumienia celu przeprowadzonych badań.

Napisany jest bardzo przejrzyście, co świadczy o dostatecznej wiedzy Doktoranta dotyczącej przedklinicznych badań rozwojowych w poszukiwaniu cząsteczek o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym.

Cel pracy został jasno sformułowany. Za cel główny pracy Doktorant obrał ocenę działania przeciwnowotworowego 14 pochodnych oliwacyny; porównanie działania cytotoksycznego tych związków w hodowlach wybranych linii komórkowych ludzkich: ostrej białaczki limfocytowej, przewlekłej białaczki szpikowej, raka płuca, raka piersi, raka jelita grubego, raka żołądka oraz włókniakomięsa linii mysiej i fibroblastach mysich, jako linii o podobnym pochodzeniu tkankowym. Kolejnym celem była ocena działania badanych związków w liniach komórkowych zawierających mutację p53 i komórkach bez tej mutacji.

Doktorant podjął się również próby rozpoznania możliwych mechanizmów działania przeciwnowotworowego badanych związków.

W rozdziale „Materiał, metody” Autor przedstawił szczegółowo czternaście pochodnych oliwacyny, które zostały opracowane i zsyntezowane w Katedrze Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Katedra ta ma duże doświadczenia w syntezie oliwacyny, o czym świadczą publikacje pochodzące z tego

ośrodka. Przedstawiony do recenzji doktorat jest, zatem kontynuacją badań nad zsyntetyzowanym produktem, co w mojej opinii dodaje pracy szczególnej wartości.

Doktorant bardzo szczegółowo scharakteryzował zastosowane w badaniach materiały oraz opisał metody i procesy zgodne z przedstawionym piśmiennictwem. Wykorzystał stosowne testy i techniki do oceny; żywotności i liczebności komórek, indeksu mitotycznego, cyklu komórkowego, apoptozy, uszkodzenia, zahamowania komórek, ilości białek p53 i p21, funkcji transportowej glikoproteiny. Wszystkie testy są uznane i zwalidowane, co gwarantuje wiarygodność uzyskanych wyników. Uzasadnił dobór elipcytyny a nie oliwacyny, jako związku referencyjnego. Oliwacyna nie jest dostępna w sprzedaży. Elipcytyna posiada podobną budowę chemiczną do oliwacyny oraz wykazuje podobną aktywność stąd wybór elipcytyny, jako związku referencyjnego nie budzi zastrzeżeń.

W doborze linii komórek nowotworowych kierował się standardami i wytycznymi Narodowego Instytutu Raka (National Cancer Institute).

Ponadto wykonał doświadczenia pozwalające ocenić działanie wybranych związków na liniach komórkowych nowotworów opornych na leczenie: białaczki szpikowej odpornej na leczenie imatynibem; raka piersi i raka jelita grubego odporne na leczenie doksorubicyną.

Wszystkie przedstawione doświadczenia Doktorant opisuje bardzo szczegółowo a niektóre techniki przedstawia w formie diagramu i obrazu, co pozwala na lepsze zrozumienie zastosowanych metod badawczych.

Należy docenić fakt, że wszystkie czynności związane z badaniem Doktorant przeprowadził osobiście gromadząc wyniki. Ta część pracy daje pogląd jak żmudny, wymagający precyzji i dyscypliny jest eksperyment laboratoryjny.

Wyniki badanych parametrów zostały poddane typowej, opisywanej w piśmiennictwie analizie statystycznej z uwzględnieniem testu istotności statystycznej i analizie wieloczynnikowej w modyfikacji własnej. Doktorant uzasadnił dobór wybranych metod statystycznych aktualnie stosowanych w tego typu analizach danych i nie budzą one zastrzeżeń.

W rozdziale "Wyniki" Autor przeprowadza bardzo wnikliwą analizę uzyskanych wyników i przedstawia je w postaci opisowej oraz w odpowiednich wykresach i tabelach dokumentując, że wśród 14 pochodnych oliwacyny, cztery z nich wykazywały przedkliniczne cechy skutecznego działania

przeciwnowotworowego ale szczególnie dwa związki nr 7 i 10 okazały się najbardziej obiecujące.

Badania wykazały, że nowe pochodne pirydokarbazoli związek 7. o wzorze sumarycznym $C_{24}H_{29}N_3O_3$ i 10 o wzorze $C_{18}H_{16}N_2O_2$ posiadają silne działanie już w niskich stężeniach w hodowlach większości badanych linii nowotworowych, a przede wszystkim w liniach nowotworowych wykazujących oporność na cytostatyki. Stanowi to podstawę do kontynuacji badań rozwojowych z tymi pochodnymi w kierunku produktu leczniczego do stosowania w onkologii.

Uzyskane przez Doktoranta wyniki świadczą, że badane pirydokarbozole mają wpływ na wzrost ekspresji białka p53 i p 21 w badanych liniach komórkowych i wykazują silniejszy efekt w porównaniu do eliptycyny.

Ponadto w przeprowadzonych badaniach Doktorant pośrednio wykazał, że mechanizmy działania niektórych pochodnych oliwacyny związane są z inhibicją tomoizomerazy II (test kometkowy), reaktywacją funkcji p53 i po części, z wzajemnymi regulacjami topoizomerazy II i p53 oraz hamowanie funkcji transportowej glikoproteiny. Tym samym Doktorant zrealizował założone cele.

Wyniki badań są oryginalne, pochodzą z własnego materiału Doktoranta.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorant omawia wyniki i umiejętnie odnosi się do danych z piśmiennictwa.

Z powodu skąpych danych dotyczących pochodnych oliwacyny i ich przeciwnowotworowych właściwości Autor analizując podobne publikacje, omawia je i kojarzy z własnymi wynikami. Świadczy to o dobrej znajomości tematu. Dużą uwagę w dyskusji Doktorant przywiązuje do metod badawczych zastosowanych do oceny pochodnych oliwacyny pod kątem ich skuteczności i toksyczności, co uważam za bardzo istotne, szczególnie w aspekcie przygotowania podstaw do dalszych badań przedklinicznych *in vivo*. Krytycznie omawia wyniki z publikacji oraz własne, co świadczy o jego wiedzy i samodzielnym myśleniu.

Autor wskazuje, że dwa zidentyfikowane przez niego związki wymagają dalszej weryfikacji w badaniach przedklinicznych *in vivo*, aby potwierdzić ich przydatność w leczeniu nowotworów i aby mogły być wprowadzone do badań klinicznych u ludzi.

Jednocześnie Doktorant podkreśla, że ograniczeniem stosowania pochodnych oliwacyny u ludzi była toksyczność. W przeprowadzonych badaniach Autor wykazał małą toksyczność obu związków w komórkach fibroblastycznych. Nie można jednak

odnieść tych wyników do badań na zwierzętach i u ludzi. Mimo tego wspieram opinię Doktoranta, że pochodne oliwacyny zasługują na uwagę.

Dwie pochodne oliwacyny wykazały szczególną aktywność cytotoksyczną w wybranych liniach komórek nowotworowych, co daje podstawy do wprowadzenia ich do dalszych badań. Mimo postępu w leczeniu chorób nowotworowych, rozwoju nowych biologicznych produktów leczniczych w dalszym ciągu istnieją niezaspokojone potrzeby lecznicze. Poszukuje się nowych rozwiązań uwzględniając również znane cząsteczki, które wykorzystuje się do nowych wskazań.

Uważam, że przedstawiona do recenzji praca jest nowatorska. Jest wartościowym wkładem do już istniejących danych na temat pirydokarbozoli i posiada ważne walory poznawcze, które mogą przełożyć się na praktyczne bardzo istotne osiągnięcia. Ponadto, jest pierwszą taką pracą w Polsce i jedną z niewielu na świecie.

W pracy nie dopatrzyłam się niedociągnięć i oceniam ją wysoko.

Mam do pracy następujące uwagi, które nie umniejszają jej wartości.

1. Proponuję aby, Autor w przyszłej publikacji rozprawy doktorskiej rozważył zmianę tytułu przenosząc ciężar zagadnienia na farmakodynamikę badanych związków a nie mechanizm działania.
2. Przedstawione przez Doktoranta wnioski są w mojej opinii podsumowaniem wyników. Uważam, że z przeprowadzonych badań nasuwa się jeden ważny wniosek, który został przez Autora sformułowany w części „dyskusja” na stronie 110 i brzmi „Należy kontynuować badania zw. nr 7 i 10, zarówno in vitro jak in vivo u zwierząt doświadczalnych, ze względu na obiecujący profil aktywności przeciwnowotworowej i perspektywę przyszłego zastosowania w terapii nowotworów”. Oczywiście zdanie to wymaga zredagowania.

Podsumowanie.

Uważam, że Autor wykazał umiejętność samodzielnej pracy naukowej. Przeprowadził ekstensywne i kompleksowe badania. Podjął się zbadania ważnego tematu, jakim jest profil farmakodynamiczny i mechanizmy działania pochodnych oliwacyny w wybranych liniach nowotworowych i doskonale poradził sobie z tym

zagadnieniem. Nawet, gdyby zbadane pochodne oliwacyny nie przeszły pomyślnie dalszych badań przedklinicznych bądź klinicznych, to uzyskane w pracy wyniki przyczyniły się do wzbogacenia wiedzy o tych związkach i ich aktywności przeciwnowotworowej. Jest to osobisty i oryginalny wkład Doktoranta.

Wobec powyższego, mam zaszczyt przedstawić wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Wrocławskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. wet. Tomasza Gębarowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Uzasadnienie.

Praca ma charakter nowatorski i pionierski w Polsce i jest jedną z nielicznych, podobnych prac na świecie. Wnosi konkretną wiedzę, która przyczyni się do dalszego rozwoju dyscypliny naukowej. Dlatego w pełni zasługuje na wyróżnienie.

Prof. nadzw dr hab. n med. Bożenna Dembowska-Bagińska

17.07.2017

