

Prof. zw. dr hab. n. med. Piotr Paluszkiewicz

Kierownik

Katedra Chirurgii i Pielęgniarstwa Chirurgicznego

Wydział Nauk o Zdrowiu

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Kierownik

Oddział Chirurgii Ogólnej i Przewodu Pokarmowego

Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej

im. św. Jana z Dukli w Lublinie

20-090 Lublin, ul. Szkolna 18, tel +817187512; 607 303 600, e-mail: ppalusz@uhc.com.pl

Ocena rozprawy doktorskiej

magister Małgorzaty Juszcak

pt. Ocena właściwości biologicznych nowych pochodnych 2-amino-1,3,4-tiadiazolu w
badaniach *in vitro* i *in vivo*

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Wojciecha Rzeskiego

Wirtualne modelowanie molekularne jest nowym kierunkiem typowania cząsteczek o pożądanym działaniu biologicznym rozwijanym w ostatnim 20-leciu. Poszukiwanie nowych cząsteczek charakteryzujących się specyficnością działania biologicznego jest fascynującą dziedziną biochemii i chemii molekularnej, w której upatruje się znaczącego postępu i możliwości kontrolowanej modulacji różnych procesów biologicznych.

Tiadiazole, heterocykliczne pierścienie o sumarycznym wzorze C_2N_2S stanowią ciekawą grupę związków organicznych o właściwościach fizykochemicznych umożliwiających znalezienie miejsc docelowych, w złożonych układach biologicznych o charakterze interakcji z receptorami, białkami przekąźnikowymi oraz kwasami nukleinowymi. Struktura tiadiazoli cechuje się pewną uniwersalnością w możliwości wytwarzania interakcji z różnymi komponentami szlaków metabolicznych i sygnałowych komórek wobec czego opisywane działania biologiczne obejmują bardzo szerokie spektrum. Rozwijanie struktur bazowych tiadiazoli poprzez wprowadzanie różnych podstawników miało na celu, w oparciu o wyniki modelowania molekularnego, wskazanie cząsteczek o większej specyficznosci działania, które mogłyby posłużyć do konstruowania nowych leków.

Wytypowanie izomeru 1,3,4 tiadiazolu jako struktury wiodącej wynikało z badania nad możliwościami interakcji z cząsteczkami bioorganicznymi posiadającymi według współczesnej wiedzy istotne znaczenie w przebiegu kluczowych procesów regulujących metabolizm i cykl komórkowy. Pochodne 1,3,4 tiadiazoli wykazując silne działanie biologiczne znalazły swoje zastosowanie w praktyce klinicznej jako diuretyki, leki przeciwbakteryjne i przeciw pasożytnicze oraz jako substancje anaboliczne wykorzystywane w niedozwolonym farmakologicznym wspieraniu regulacji funkcji mięśni u sportowców. Manipulując rodzajami podstawników i wprowadzając pochodne halogenkowe skonstruowano pochodne chlorowe i bromowe, w celu ułatwienia penetracji przez błonową i dając możliwość wywołania silniejszych efektów biologicznych.

Naturalnym biegiem zdarzeń jest pokusa wykorzystywania nowych cząsteczek w regulacji cyklu komórkowego i indukcji apoptozy komórek nowotworowych, co potencjalnie stwarza nadzieję na sukces w rozwoju technik systemowej terapii przeciwnowotworowej. W dobie dzisiejszej terapii oparte na stosowaniu nowych substancji posiadających jasno zdefiniowane cele molekularne pozostają głównym nurtem badań współczesnej onkologii. W terapii personalizowanej upatruje się wobec tego przełomów w leczeniu przeciwnowotworowym, który częściowo osiągnięto w ostatnich latach w odniesieniu niestety tylko do niektórych typów nowotworów złośliwych. nierozstrzygniętym zagadnieniem pozostaje specyficzność terapii, redukcja działań niepożądanych, oporność na leczenie, dokomórkowa transmisja cząsteczek, szczególnie w guzach litych lub oddzielonych naturalnymi barierami, jaką jest możliwość penetracji do tkanek centralnego układu nerwowego. Mając na uwadze te szczególne aspekty choroby nowotworowej transpozycja badań przedklinicznych do terapii chorych napotyka na szereg zaskakujących zwrotów wobec czego ostatecznie jedynie nieliczne cząsteczki ostatecznie trafiają do badań klinicznych wyższych faz.

Badania nad pochodnymi tiadiazoli w aspekcie działania przeciwnowotworowego dotychczas nie przyniosły przełomu a prowadzone badania kliniczne nie potwierdziły skuteczności terapii przy poważnych działaniach niepożądanych. Nie zmienia to faktu, że specyficzna struktura 1,3,4 tiadiazoli posiada znaczący potencjał a badania nowych pochodnych mogą stanowić przełom lub znaczący postęp w poznawaniu nowych mechanizmów odpowiedzi na ksenobiotyki.

Podjęcie badań nad mechanizmami działania przeciwnowotworowego dwóch, nowo zsyntetyzowanych pochodnych 1,3,4 tiadiazoli jest szczególną aktywnością naukową wpisującą się w nowoczesne badania przedkliniczne w onkologii molekularnej. Uzupełnienie tych badań o ustalenie oddziaływania badanych pochodnych z prawidłowymi komórkami centralnego układu nerwowego dodatkowo wzbogaca wartość całego projektu stanowi o jego unikalności i nowoczesności oraz wysokich walorach poznawczych. Z tego powodu przedstawione w Rozprawie Doktorskiej badania przyjmuję z największym uznaniem.

Przedstawiona do oceny Rozprawa Doktorska autorstwa Pani mgr Małgorzaty Juszcak jest podsumowaniem badań Autorki nad nowymi pochodnymi halogenkowymi 1,3,4 tiadiazoli mających na celu ustalenie ich działania przeciwnowotworowego. Dodatkowo przeprowadzono badania nad działaniem neuroprotektynowym, ze względu na spodziewaną penetrację podanych cząsteczek do centralnego układu nerwowego. Rozprawę doktorską przedstawiono w postaci 155 stron wydruku komputerowego. Przedstawiony układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich w naukach biologicznych i medycznych i nie budzi zastrzeżeń.

Wstęp pracy jest obszernym opracowaniem przeglądowym obejmującym charakterystykę chemiczną i fizykochemiczną 1,3,4 tiadiazoli i ich pochodnych oraz podstawowe informacje dotyczące konstruowania pochodnych w oparciu o wirtualne modelowanie molekularne. Opisano dodatkowo poznane dotychczas mechanizmy aktywności biologicznej pochodnych 1,3,4 tiadiazoli, wyniki wstępnych badań klinicznych z kilkoma pochodnymi oraz wyniki badań teratogenności badanych związków. Szczegółowo przedstawiono dane z piśmiennictwa wskazujące na poznane dotychczas cele molekularne, związane z podawaniem pochodnych 1,3,4 tiadiazoli, które reprezentują różne szlaki metaboliczne i sygnałowe *Eucariota*. W osobnym podrozdziale Autorka umieściła informacje dotyczące interakcji pochodnych 1,3,4 tiadiazoli z komórkami centralnego układu nerwowego oraz ich wpływu na funkcję mózgu w modelach eksperymentalnych drgawek, depresji i percepcji bólu. Wstęp został uzupełniony o mechanizmy działania przeciwbakteryjnego, przeciwgrzybiczego i przeciwprzywrotniakowego oraz o zastosowania pochodnych w ochronie roślin. Bardzo

rozbudowany wstęp wobec planowanych badań wydaje się koniecznością i sam w sobie stanowi doskonałą pracę przeglądową mogącą stanowić samodzielne opracowanie.

Cel zaplanowanych badań jest precyzyjnie sformułowany i został przedstawiony poprzez cele szczegółowe, znacznie rozbudowane i zawierające liczne podpunkty. Powoduje to że całość projektu jest wielotematyczna i wymaga zastosowania wielu technik badawczych. Tak liczne kierunki prowadzonych badań powodują, że wprawdzie uzyskuje się bardziej uszczegółowiony obraz badanego zagadnienia jednak ogranicza to zdolności interpretacyjne. Pomimo tego uważam, że zaplanowane badania znacznie przekraczają opracowania naukowe przedstawiane w postępowaniu aplikacyjnym o stopień doktora, co wymaga dodatkowego podkreślenia.

Wiarygodność przedstawianych dowodów naukowych dostarczanych na podstawie uzyskanych wyników badań jest uzależniona od doboru **metod** badawczych oraz precyzji ich wykonania. Zaplanowane liczne eksperymenty wymagały od Doktorantki bardzo szczegółowego przygotowania laboratoryjnego oraz posiadania biegłości w posługiwaniu się różnymi metodami stosowanymi w syntezie związków organicznych oraz technik biologii molekularnej. Opis otrzymania nowych pochodnych halogenkowych jest bardzo skrótowy i nie zawiera kontroli wydajności procesu syntezy oraz sposobów kontrolowania homogenności otrzymanych cząsteczek. Przyjmuję, że Doktorantka otrzymała nowe cząsteczki do dalszych badań technikami biologii molekularnej od innego Zespołu badawczego, co należałoby zaznaczyć w tekście pracy, nie wnikając w szczegóły metodyczne prowadzonej syntezy chemicznej. Ze względu na nieznaną stabilność roztworów 1,3,4 tiadiazoli w DMSO słusznie przygotowywano je bezpośrednio przed rozpoczęciem eksperymentów. Ważne było ustalenie toksyczności rozpuszczalnika stosowanego do wprowadzenia nowych pochodnych halogenkowych.

W badaniach *in vitro* wykorzystano liczne linie komórek nowotworowych pochodzenia ektodermalnego i mezenchymalnego (łącznie 7 różnych linii) oraz linie komórek prawidłowych pochodzące z fibroblastów ludzkich, astrogleju, neuronów, oligodendrocytów i hepatocytów. Techniki przygotowywania hodowli, pasażowania hodowli i doboru podłoży nie budzą zastrzeżeń. Oznaczano żywotność komórek przy pomocy testu redukcji MTT do formazanu, oznaczano aktywność syntezy DNA testem wiązania bromodezoksyurydyny (BrdU). Badano dodatkowo zmiany morfologiczne

komórek hodowli z wykorzystaniem barwienia techniką May-Grünwalda-Giemsy (MGG) i dodatkowo wykorzystując komputerową analizę obrazów mikroskopowych. Podczas prowadzenia badań w liniach komórkowych wykonywano immunodetekcję białek techniką Western-blotting. Poszukując mechanizmów działania badanych związków badano ekspresję genów kodujących białka ERK1/2 i CREB oraz oceniano odsetki komórek w różnych fazach cyklu komórkowego przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej z barwieniem oranżem akrydyny. Zdolność do apoptozy oceniano wykrywając fragmentowanie DNA w teście ELISA a efektywność cytotoksyczną oceniano aktywnością dehydrogenazy mleczanowej w podłożu hodowlanym. Komórki pochodzące z hodowli astrocytów i oligodendrocytów dodatkowo badano w mikroskopie fluorescencyjnym wykorzystując Barwnik Hoechst 33342.

Po zakończeniu rozbudowanych badań molekularnych prowadzonych w liniach komórkowych Doktorantka przeprowadziła analizy *in vivo* u szczurów Wistar (*wt*), którym indukowano nowotwór złośliwy poprzez podskórne podanie komórek linii C6 odpowiadających glejakowi centralnego układu nerwowego i obserwując niezakłócony 14-dniowy wzrost guza. Interwencję prowadzono z wykorzystaniem pochodnej chlorowej 1,3,4 tiadiazolu w celu ustalenia biodystrybucji i dynamiki eliminacji badanej substancji. Mając na uwadze krótki okres półtrwania chlorowej pochodnej 1,3,4 tiadiazolu zaplanowano badanie interwencyjne, w którym iniekcji podskórnej komórek linii C6 towarzyszyła implantacja pompy do ciągłej infuzji badanego związku chemicznego przez 14 dni. Badając skuteczność terapeutyczną ustalano aktywność proliferacyjną komórek eksperymentalnie wszczepionego podskórnie glejaka z wykorzystaniem immunohistochemicznej reakcji z przeciwciałem Ki-67 i wyznaczeniem indeksu mitotycznego MIB-1. Na przeprowadzenie doświadczeń *in vivo* uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej, co zaznaczono w pracy. Uzyskane wyniki poddano analizie probabilistycznej, nie podając rodzaju stosowanych testów, rozkładu zmiennych ani technik wyliczenia wielkości grup. Nie podano również punktów odcięcia wskazujących na odsetkową wartość błędu wnioskowania.

Wyniki przedstawiono na 40 stronach wydruku komputerowego umieszczając tam liczne ryciny i fotografie. Ilość uzyskanych wyników wymaga od czytelnika skupienia przy ocenie uzyskanych rezultatów, jednak wyniki przedstawione są czytelnie

z wielką dbałością o stronę graficzną. Należy uznać, że jakość przedstawionych fotografii oraz grafik pochodzących z elektroforegramów posiada wysoką wartość merytoryczną i cechuje się wyjątkową przejrzystością i czytelnością.

Wykorzystując test MTT stwierdzono obniżenie żywotności komórek nowotworowych a wykorzystując test z bromodezoksyurydyną obniżenie syntezy DNA zależne od dawki podczas ekspozycji na obie badane pochodne halogenkowe 1,3,4 tiadiazoli. W badaniach morfologicznych stwierdzono również zależne od dawki obkurczanie się komórek, ich wydłużanie i fragmentację cytoplazmy oraz utratę kontaktu między komórkami, stosując oba badane związki chemiczne we wszystkich liniach komórek nowotworowych poddanych badaniu.

Szczegółowe badania mechanizmów działania przeciwnowotworowego przeprowadzono na linii A549 reprezentującej niedrobnokomórkowego raka płuca. Badano szlak sygnałowy kinazy ERK1/2 oraz szlak kinazy Akt. Ustalano efekt dawki podanej pochodnej chlorkowej 1,3,4 tiadiazolu. Stwierdzono obniżoną fosforylację kinaz szlaku ERK1/2 oraz zmiany fosforylacji kinazy Akt. Nie stwierdzono różnic w ekspresji genów dla białka ERK1 oraz CREB. W linii komórek raka niedrobnokomórkowego płuca A549 pod wpływem 24 godzinnej ekspozycji na pochodną chlorkową 1,3,4 tiadiazolu obserwowano zahamowanie cyklu komórkowego polegającego na zmniejszeniu ilości komórek w fazie S i G2/M oraz zwiększeniu odsetka komórek w fazie G0/G1. Zahamowanie proliferacji w badaniu ilości komórek w różnych fazach cyklu komórkowego było zależne od dawki. Ustalono, że ekspozycja komórek na pochodną chlorkową 1,3,4 tiadiazolu zmieniała stężenie białek kontrolujących punkty kontrole cyklu komórkowego, w tym zwiększała stężenie p27/Kip1 i nieznacznie obniżała stężenie p21Waf1/Cip1 i cykliny D1. W teście ELISA nie stwierdzono zwiększonej fragmentacji DNA pod wpływem badanego związku chemicznego.

Badanie biodystrybucji i szybkości eliminacji pochodnej chlorkowej 1,3,4 tiadiazolu wykazało maksymalne stężenie tkankowe po 15 min od infuzji i po 30 minutach w centralnym układzie nerwowym. Badana substancja była szybko eliminowana i po 6 godzinach od infuzji była wykrywalna śladowo. Istotną informacją jest stężenie w guzie nowotworowym, 15-27 razy niższe niż w tkankach obwodowych (wątroba, nerki, płuca) i 45 razy niższe niż we krwi.

Bardzo ciekawe badania *in vivo* nie potwierdziły skuteczności przeciwnowotworowej, jedynie nieznacznie obniżając całkowitą masę guza i

zmniejszając indeks proliferacyjny. Dodatkowo poddając badaniu inne tkanki obwodowe nie stwierdzono morfologicznych wykładników toksyczności prowadzonej terapii.

Drugą część eksperymentu stanowiły badania oddziaływania badanych pochodnych halogenkowych 1,3,4 tiadiazoli na komórki prawidłowe pochodzące ze skóry (fibroblasty) i wątroby (hepatocyty) oraz centralnego układu nerwowego. Stwierdzono istotne działanie cytotoksyczne pochodnej chlorowej na wszystkie badane linie komórkowe z wyjątkiem fibroblastów, szczególnie w stężeniach powyżej 25 μ M. Pochodna bromowa wykazywała w wysokich stężeniach toksyczność również wobec fibroblastów, jednak zauważono działanie protekcyjne w odniesieniu do oligodendrocytów i neuronów, zależne od dawki, w teście pomiaru aktywności dehydrogenazy mleczanowej w podłożu hodowlanym. Z tego powodu rozszerzono eksperyment o badanie neuroprotekcje pochodnej bromowej w liniach komórek centralnego układu nerwowego. Badania zrealizowano w obecności znanych neurotoksyn, w tym glutaminianu, warunkach stresu troficznego, oraz cis-platyny. Stwierdzono działanie ochronne na badane linie komórkowe w przedstawionych modelach eksperymentalnych.

Dyskusja jest bardzo silną stroną pracy, prowadzona rzeczowo i skrupulatnie przedstawia uzyskane wyniki w odniesieniu do aktualnego i starannie dobranego piśmiennictwa i ostrożnie przedstawia hipotezy i plany kontynuacji badań nad pochodnymi tiadiazoli. Zdobyte umiejętności pracy laboratoryjnej i doświadczenie badawcze umożliwi Doktorantce dość łatwe przeprowadzenie czytelnika przez skomplikowane zagadnienia molekularne uwzględniane przy projektowaniu i wdrażaniu do badań leków przeciwnowotworowych i neuroprotekcyjnych. Badania dają częściową odpowiedź na opisywaną nieskuteczność terapeutyczną oraz nasilone działania niepożądane obserwowane w badaniach klinicznych. Obserwacje te dają asumpt do badań z wykorzystaniem innych pochodnych w celu podniesienia skuteczności, zmiany profilu farmakokinetycznego i obniżenia oddziaływania na komórki prawidłowe.

Wnioski podsumowujące bardzo rozbudowane badania zawarto w sześciu punktach, z których za najważniejsze uważam opisanie działania neuroprotekcijnego

poходnej bromowej 1,3,4 tiadiazolu. To oryginalne odkrycie powinno zostać potwierdzone w kolejnych badaniach z wykorzystaniem innych modeli eksperymentalnych. Stwierdzenie działania przeciwnowotworowego, polegającego głównie na zatrzymaniu cyklu komórkowego, na obecnym etapie stwarza wrażenie obserwacji eksperymentalnej a nieznane przyczyny niskiej penetracji badanej pochodnej chlorkowej do guza nowotworowego wymagają dalszych badań.

Konkludując stwierdzam, że zaplanowane badania wykorzystujące różne techniki współczesnej farmakologii doświadczalnej w tym modelowanie molekularne, synteza nowych cząsteczek, ustalanie mechanizmów molekularnych, biegłość w pracy eksperymentalnej z liniami komórkowymi i zwierzętami laboratoryjnymi znacznie przekraczają wymogi stawiane pracom przedstawianym w postępowaniu aplikacyjnym o stopień naukowy doktora. Całość przedstawionych badań cechuje się jednak konsekwencją, wysoką jakością metodyczną, integralnością merytoryczną i walorami innowacyjności, co niewątpliwie jest zasługą nałożonych kierunków badań w Zespole kierowanym przez Promotora, posiadającym ugruntowaną wysoką pozycję w badaniach molekularnych substancji działających antyproliferacyjnie. Realizacja tego typu badań jest możliwa jedynie w nielicznych ośrodkach, wymaga wielkiego zaangażowania i umiejętności laboratoryjnych i z tego powodu zasługuje na szczególne uznanie i wyróżnienie.

Mając powyższe na uwadze moja wysoka ocena całości dysertacji jest podstawą do złożenia formalnego wniosku do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Juszcak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 27 listopada 2016 roku

Piotr Paluszniak