

Prof. dr hab. Marek Rusin
Centrum Badań Translacyjnych i
Biologii Molekularnej Nowotworów
Narodowy Instytut Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Gliwice, 31.08.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Michała Kuczaka zatytułowanej „Badanie aktywności proliferacyjnej oraz mechanizmów działania pochodnych chinoliny w celu potencjalnego zastosowania w terapii przeciwnowotworowej”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma układ odbiegający nieco od stosowanego zwykle podziału publikacji naukowych na Wstęp, Materiał i Metody, Wyniki i Dyskusję. Zamiast tego zastosowano układ: Część teoretyczna, Część doświadczalna, Podsumowanie i wnioski, Materiał i metody eksperymentalne. Osobiście preferuję układ, w którym występuje Dyskusja a więc element rozprawy, w którym autor konfrontuje swoje wyniki z wynikami opublikowanymi przez innych oraz w którym komentuje wyniki lub tworzone hipotezy robocze do dalszych badań. W niniejszej rozprawie autor dokonuje komentarza i konfrontacji na bieżąco opisując poszczególne wyniki, co również jest akceptowalne. Rozprawa jest dość obszerna. Nie licząc bibliografii, składa się ze 149 stron tekstu.

Głównym problemem chemioterapii nowotworów jest brak selektywnego leku, który niszczyłby komórki nowotworowe nie uszkadzając komórek prawidłowych. Istnieją już co prawda leki charakteryzujące się dużą selektywnością, ale są one stosowane do leczenia stosunkowo rzadko występujących nowotworów, m.in. niektórych form białaczki. Nadal większość stosowanych chemioterapeutyków to substancje o stosunkowo niewielkiej selektywności. Kolejnym problemem chemioterapii jest rozwijające się w jej trakcie oporność na leki. Dlatego w chemioterapii nowotworów rzadko stosuje się jeden lek. Najczęściej podaje się kilka różnych substancji o zróżnicowanym mechanizmie działania, co poprawia zarówno skuteczność jak i zmniejsza ryzyko pojawienia się oporności. Innym rozwiązaniem wspomnianych problemów chemioterapii jest zastosowanie tzw. podejścia polifarmakologicznego. Polega ono na zastosowaniu substancji, które mają kilka molekularnych celów działania. Takie cząsteczki mogą działać na kilka różnych białek co

może poprawiać skuteczność przy teoretycznie mniejszej toksyczności. W niniejszej rozprawie autor badał działanie związków o potencjale polifarmakologicznym, których wspólnym elementem jest występowanie chinoliny – dwupierścieniowej cząsteczki zawierającej jeden pierścień aromatyczny oraz drugi pierścień zawierający atom azotu. Do pierścieni chinoliny dołączono różne podstawniki i w ten sposób powstały cząsteczki, których biologiczne właściwości testowano w niniejszej rozprawie.

Celem pracy doktorskiej było zbadanie aktywności antyproliferacyjnej oraz próba lepszego zrozumienia mechanizmów działania wspomnianych pochodnych chinoliny. Badano działanie wybranych związków w odniesieniu do komórek nowotworowych różnego pochodzenia (rak jelita grubego, trzustki oraz glejak) a uzyskane wyniki porównywano z wpływem związków na prawidłowe ludzkie komórki (fibroblasty). Dodatkowo komórki nowotworowe różniły się statusem genu *TP53* kodującego jedno z najważniejszych białek chroniących komórkę przed przekształceniem się w komórkę nowotworową. Układ eksperymentalny był stosunkowo prosty. Komórki w hodowli *in vitro* ekspozycje przez określony czas na badane związki, a następnie mierzono proliferację komórek testem MTS, określano rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu proliferacyjnego przy pomocy cytometrii przepływowej, oceniano stres oksydacyjny przy pomocy pomiaru reaktywnych form tlenu oraz ilości zredukowanego glutationu w komórce. W stosunku do wybranych genów oraz komórek przeprowadzono bardziej szczegółowe badania molekularnej odpowiedzi na działanie zastosowanych związków. Badano poziom aktywności wybranych genów kodujących białka łagodzące stres oksydacyjny, białka cyklu komórkowego i programowanej śmierci komórek (apoptozy) oraz białka kodujące transportery glukozy.

Przeprowadzenie zaplanowanych doświadczeń wymagało bardzo dużego nakładu pracy. Przebadano antyproliferacyjne właściwości 82 pochodnych chinoliny przeprowadzając test MTS na wywodzących się z raka jelita grubego liniach komórkowych HCT116 w wersji wyjściowej oraz w wersji pozbawionej białka p53. Dla porównania test przeprowadzono na prawidłowych ludzkich fibroblastach. Po przebadaniu 82 pochodnych wybrano 10 charakteryzujących się najkorzystniejszymi właściwościami antyproliferacyjnymi i przetestowano ich działania na rozszerzonym panelu linii komórkowych. Dwa związki SQ31 i SQ62 wykazywały zróżnicowane działania w stosunku do komórek HCT116 z różnym statusem genu *TP53*. Dwa związki SQ48, SQ63 wykazywały bardzo dobre właściwości antyproliferacyjne, działały w niskich stężeniach i selektywnie w stosunku do komórek nowotworowych.

Do molekularnej analizy mechanizmów działania wybrano związki SQ48 i SQ60. SQ60 wybrano ze względu na duże różnice w aktywności w stosunku do dwóch różnych linii komórkowych pochodzących z różnych nowotworów i różniących się statusem genu *TP53* (HCT116 i U-251). Testowane związki zwiększały odsetek komórek znajdujących się w fazie syntezy DNA cyklu komórkowego natomiast zmniejszał się odsetek komórek w fazie G1. Testem aneksynowym badano również indukcję apoptozy. Najsilniejszy efekt wywołał związek SQ48 w komórkach HCT116. Oba związki w obu liniach komórkowych generowały po 24 godzinach inkubacji zwiększoną ilość reaktywnych form tlenu i spadek ilości zredukowanej formy glutationu, co świadczy o zachodzącym procesie ochrony komórek przed stresem oksydacyjnym. W mojej ocenie najciekawszą obserwacją poczynioną na tym etapie badań było dostrzeżenie wzrostu ilości białka HIF-1 α oraz białka HO-1 (oksygenaza hemowa) w komórkach U-251 traktowanych SQ48 i SQ60. Zwykle wzrost ilości HIF-1 α odbywa się w warunkach obniżonego stężenia tlenu w środowisku komórek (hipoksja). W tym przypadku komórki rosły w warunkach tlenowych. Oba testowane związki wywołały molekularny skutek podobny do hipoksji. Autor sugeruje, powołując się na dane literaturowe, że to stres oksydacyjny generuje wzrost ekspresji białka HIF-1 α . Bardzo możliwe. Jednak zabrakło mi wyjaśnienia głównego mechanizmu aktywacji tego czynnika, w którym biorą udział białka VHL i hydroksylaza prolinowa. W tym miejscu rozprawy autor w swoim komentarzu do uzyskanych wyników przeoczył dość istotną informację z piśmiennictwa. Mianowicie, gen oksygenazy hemowej-1 (HO-1, oficjalna nazwa *HMOX1*) jest aktywowany przez białko HIF-1 α (przykładowo Kang MJ, Kim HJ, Kim HK, Lee JY, Kim DH, Jung KJ, Kim KW, Baik HS, Yoo MA, Yu BP, Chung HY. The effect of age and calorie restriction on HIF-1-responsive genes in aged liver. *Biogerontology*. 2005;6(1):27-37. doi: 10.1007/s10522-004-7381-z. PMID: 15834661; Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem*. 1997 Feb 28;272(9):5375-81. PMID: 9038135.). Tak więc zaobserwowany wzrost ekspresji HO-1 jest najprawdopodobniej konsekwencją zaobserwowanej przez autora aktywacji HIF-1 α . Jest to w mojej ocenie bardzo ciekawa obserwacja rodząca interesujące pytania. A mianowicie jaki jest mechanizm aktywacji HIF-1 α w komórkach U-251 pod wpływem SQ48 i SQ60 i dlaczego ten mechanizm praktycznie nie działa w komórkach HCT-116? Nie oczekuję od doktoranta odpowiedzi na te pytania, ale może warto w dalszych badaniach podążyć tą ścieżką. Z pewnością należy wziąć pod uwagę wspomniane wyżej opublikowane obserwacje przy wyjaśnianiu mechanizmu działania SQ48 i SQ60.

W kolejnej części pracy autor dokonał pewnej modyfikacji testowanych pochodnych chinoliny, w podstawniku sterylowym zastąpiono pierścień fenyłowy pierścieniem furanu. W oparciu o tą zmianę zsyntetyzowano serię ośmiu nowych analogów chinoliny i przeprowadzono testy ich aktywności antyproliferacyjnej oraz analizowano wstępnie mechanizm molekularnego działania. Spośród pochodnych furanylwinylochinoliny największą aktywność wykazała pochodna FVQ9. Wartość IC₅₀ tego związku przyjmowała wartość poniżej 0,1 μM. Autor zbadał wpływ FVQ9 na aktywację genów *SOD2* i *CAT* kodujących białka łagodzące skutki stresu oksydacyjnego. Związek powodował umiarkowaną aktywację *SOD2* w komórkach HCT116 oraz U-251. W komórkach HCT116 związek FVQ9 powodował akumulację p53 oraz białek genów regulowanych przez p53 – p21 i FAS. Ponadto nastąpiła silna akumulacja białka HO-1, co mogłoby świadczyć o aktywacji czynnika transkrypcyjnego HIF-1α. Jednak autor stwierdził, że do aktywacji HIF-1α nie doszło (wyników nie zaprezentowano). Istnieje więc inna przyczyna akumulacji HO-1. Ponadto, FVQ9 powodował silną akumulację transportera glukozy czyli białka GLUT1. Z tego powodu autor poświęcił więcej uwagi zbadaniu wpływu związku FVQ9 na ekspresję genów kodujących transportery glukozy badając je metodą RT-PCR, czyli określając względną liczbę ich cząsteczek mRNA w komórce. Ten eksperyment wykazał, że rzeczywiście związek FVQ9 aktywuje gen *GLUT-1* w komórkach zawierających prawidłowy gen p53, jednak stopień aktywacji nie jest duży. Ponadto związek aktywował gen innego transportera glukozy – *GLUT-4* w komórkach pozbawionych prawidłowego białka p53. W odniesieniu do tej części doświadczeń mam pewną uwagę. Autor użył związku o skrócie BAY-876 jako pozytywnej kontroli (inhibitor białek GLUT) w doświadczeniach w których badał ekspresję genów GLUT na poziomie mRNA. Trzeba pamiętać, że ten inhibitor hamuje aktywność białek (głównie GLUT-1) a nie transkrypcję ich genów. Mimo tego, wnioski uzyskane z tej fazy doświadczeń są poprawne.

W mojej opinii praca zyskałaby na klarowności gdyby rozdzielić prezentację wyników od ich komentarza (dyskusji). Ułatwiłoby to przyswojenie najistotniejszych informacji. W obecnej formie poszczególne fakty i obserwacje są „rozwodnione” komentarzem i spekulacjami co utrudnia wyłapanie najistotniejszych treści. Wysoko oceniam pomysł, który był inspiracją do przygotowania tematu rozprawy, podziwiam też nakład pracy laboratoryjnej, jaka została włożona w wykonanie doświadczeń. Praca jest dobrze napisana pod względem językowym. Jeśli spełnia ona odpowiednie wymagania formalne, zwłaszcza te dotyczące publikacji wyników, należy rozważyć jej wyróżnienie.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr Michała Kuczaka jest opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane ustawą dla dysertacji doktorskich. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana magistra zatytułowana „**Badanie aktywności proliferacyjnej oraz mechanizmów działania pochodnych chinoliny w celu potencjalnego zastosowania w terapii przeciwnowotworowej**”, stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz spełnia wymogi art. 14 ust. 2 pkt 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669), a stopień doktora może być nadany w dziedzinie i dyscyplinie określonej w przepisach wydanych na podstawie art. 5 ust. 3 tej ustawy. W związku z powyższym, przedstawiam wniosek o dopuszczenie Pana mgr Michała Kuczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Marek Rusin

