



## Ocena rozprawy doktorskiej

pt.: „*Ocena aktywności przeciwnowotworowej wybranych pochodnych*

*1,3-tiazyn w komórkowym modelu raka jelita grubego*”

wykonanej przez Pana mgr Arkadiusza M. Czerwonkę

w Zakładzie Wirusologii i Immunologii Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie

Praca doktorska Pana mgr Arkadiusza Czerwonki wpisuje się w intensywnie rozwijający się obszar badawczy poszukiwania potencjalnych leków o działaniu przeciwnowotworowym. Jako przedmiot badań Autor wybrał benzo- oraz hetero-1,3-tiazynony podstawione ugrupowaniem 2,4-dihydroksyfenylowym. Heterocykliczne układy modyfikowane rezorcynolem stanowią obecnie silnie eksplorowaną grupę połączeń w zakresie działania przeciwnowotworowego oraz neuroprotekcijnego. Wiele tego typu grup związków jest chronionych zarówno w zakresie syntezy jak i działania biologicznego, a właścicielami patentów są znane firmy farmaceutyczne. Niektóre z nich działają na poziomie nM, mają zadawalającą farmakokinetykę, akceptowalne działania niepożądane i zostały wdrożone do badań klinicznych w kierunku terapii zarówno nowotworów litych jak i hematologicznych. Ze względu na złożony oraz wielokierunkowy mechanizm działania molekularnego, układy te stanowią dość obiecującą grupę związków, dla której przewiduje się ponadto małe prawdopodobieństwo pojawienia się oporności. Z tego względu opiniowana dysertacja jak najbardziej odpowiada oczekiwaniom, jakie kieruje się w stronę ośrodków akademickich, zajmujących się badaniami nad potencjalnymi lekami przeciwnowotworowymi czy substancjami chemoprewencyjnymi.

Przedłożona praca posiada charakter oryginalnej, eksperymentalnej rozprawy naukowej. Zawiera ona rozdziały typowe dla prac doktorskich, które są poprzedzone zestawieniem stosowanych skrótów, a kończy się wykazem rycin oraz tabel. Decyduje to o przejrzystości opracowania oraz ułatwia jego czytanie.

Część teoretyczna rozprawy doktorskiej Pana mgr Czerwonki została podzielona na trzy opracowania. Pierwsze dotyczy charakterystyki jelita grubego oraz rozwoju, epidemiologii, klasyfikacji, profilaktyki i leczenia nowotworów związanych z jelitem grubym. W drugim Autor przedstawił przebieg cyklu komórkowego i jego regulację. Tematem trzeciego opracowania jest natomiast biologiczna aktywność 1,3-tiazyn z uwzględnieniem





molekularnego poziomu ich działania. Rozdziały te stanowią doskonałe odniesienie dla realizowanych zadań badawczych oraz podstawę do dyskusji.

Autor bardzo dobrze wykorzystał szeroki zakres piśmiennictwa, obszerną własną wiedzę oraz warsztat i doświadczenie Ośrodków, w których wykonywał pracę, właściwie sformułował cel badań, który następnie konsekwentnie realizował.

Pan mgr A. Czerwonka oceniał 6 połączeń z grupy 4*H*-3,1-benzotiazyn-4-onów, 4*H*-benzofuro[1,3]tiazyn-4-onów oraz 3'*H*-spiro[benzo[*d*][1,3]tiazyno-4,1'-izobenzofuran]-3'-onów, które są układami bardzo słabo zbadanymi w zakresie działania biologicznego. Posiadają one ugrupowanie benzenodiolu, podstawione w niektórych analogach atomem chloru, które jest wskazywane jako korzystne dla kierunkowego działania przeciwnowotworowego. Różnice w budowie serii badanych połączeń powodują zmianę lipofilowości, która decyduje o procesach podziału oraz dystrybucji związku. Uwzględniając natomiast wpływ atomu chloru na lokalną hydrofobowość cząsteczki należy przyjąć, iż może to mieć istotne znaczenie przy oddziaływaniu z potencjalnym celem molekularnym. Wprowadzenie atomu chloru lub podstawnika etylowego do ugrupowania benzenodiolu, z reguły wiąże się też z lepszą aktywnością antyproliferacyjną odpowiednich heterocyklicznych pochodnych. W przypadku połączeń z chlorowcem może to być jednak przyczyną wzrostu toksyczności, co też potwierdziły rezultaty badań prowadzonych przez Pana Magistra.

Uzyskane wyniki pierwszego etapu badań, określające wpływ wszystkich badanych związków na poziom proliferacji i żywotność komórek zmienionych nowotworowo oraz ich działanie cytotoksyczne wobec komórek prawidłowych, pozwoliły na wyselekcjonowanie 2-(2,4-dihydroksyfenilo)-4*H*-benzofuro[3,2-*d*][1,3]tiazyn-4-onu (połączenie nr 1135) do szerszego spektrum badań biologicznych. Związek charakteryzował się najsilniejszym potencjałem przeciwo proliferacyjnym wobec komórek nowotworowych ludzkiego raka jelita grubego (linie HT-29 i LS180) oraz niską cytotoksycznością wobec prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego. Było to podstawą do kontynuowania badań, m.in. na poziomie molekularnym w komórkach nowotworowych obu linii ludzkiego raka jelita grubego.

Kolejne testy wykazały brak oddziaływań związku na morfologię oraz indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach raka jelita grubego linii HT-29 i LS180. Natomiast ocena wpływu związku na cykl komórkowy oraz wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałne potwierdziła jego antyproliferacyjny potencjał. W komórkach linii HT-29 związek m.in. powodował zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G<sub>2</sub>-M, zmniejszenie poziomu fosforylacji kinazy Akt





oraz wzrost ekspresji cykliny A2. W komórkach linii LS180 obserwowano m.in. zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G<sub>1</sub>, wzrost ekspresji białka p27 i białek Bcl-xl, spadek ekspresji CDK4, cyklin B, A oraz fosforylacji białka Rb.

Zakres przeprowadzonych przez Doktoranta badań oraz ich dokumentacja świadczą o dobrym opanowaniu warsztatu badawczego oraz właściwej interpretacji wyników. Ryciny oraz tabele są dobrze opracowane graficznie oraz dokładnie opisane, co znacznie ułatwia ocenę pracy. Otrzymane wyniki poddano obróbce statystycznej, stosując rekomendowane w tego typu badaniach testy.

Ze względu na swój charakter, rozdział **Omówienie wyników**, powinien być raczej zatytułowany „Omówienie wyników i dyskusja”, a bardziej odpowiednim miejscem pierwszego akapitu wydaje się być wstęp. Pomimo uwag formalnych, jest to część pracy bardzo interesująca w aspekcie merytorycznym. Autor konfrontował otrzymane wyniki z rezultatami innych badań oraz poddał je dogłębnej analizie. Krytycznie spojrzął też na wyniki własne uzyskane z zastosowaniem wybranych modeli badawczych. Świadczy to o dużej znajomości zagadnień związanych z tematem pracy, dojrzałości oraz analitycznym podejściu przy interpretacji danych eksperymentalnych. Dodatkowo, na podstawie uzyskanych wyników opisujących molekularne działanie związku **1135**, Autor zaproponował schemat przypuszczalnego mechanizmu jego działania w komórkach raka jelita grubego linii LS180.

W rozdziale **Materiały** Autor szczegółowo scharakteryzował zastosowany w badaniach materiał biologiczny i chemiczny. Brakuje tylko informacji o czystości badanych związków. Procedury przeprowadzonych postępowań przygotowawczych oraz metod analitycznych mających na celu ocenę żywotności, proliferacji, cytotoksyczności komórek oraz badania mechanizmów molekularnych zostały przedstawione dokładnie i wyczerpująco w rozdziale **Metody**. Spełniają one wysokie standardy stawiane współczesnym pracom badawczym.

**Wnioski** zostały opracowane w postaci 8 punktów, które czasem są raczej uogólnieniem uzyskanych wyników niż „typowymi” wnioskami, ale bardzo dobrze korelują z postawionym celem pracy i założonymi hipotezami badawczymi.

Zestawiony przegląd **Piśmiennictwa** nie jest zbyt obszerny, ale zadawalający i korespondujący z całością pracy. Z reguły są to publikacje anglojęzyczne, renomowanych czasopism o cyrkulacji międzynarodowej z kilkunastu ostatnich lat.

W pracy zauważyłam pewne wątpliwe sformułowania oraz drobne uchybienia czy błędy redakcyjne:



- W systematycznej nomenklaturze badanych związków powinno pojawić się określenie „fenylo-„ dla podstawnika 2,4-dihydroksyfenylowego, a nie „fenyl“. Prawdopodobnie należało z języka angielskiego. W opracowaniu w języku polskim należałoby uwzględnić powyższą uwagę.
  - Podobnie nazwa systematyczna MTT powinna brzmieć: „bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowy”;
  - str. 13, zdanie: „Następuje tu również sekrecja związków, takich jak dwuwęglany czy potas” budzi wątpliwości, podobnie fragment (str. 21) „różnorodne izomery sprzężonego kwasu linolowego CLA”.
  - Ponad to w Rozdziale 3. Pochodne 1,3-tiazyn – znajduje się kilka mało precyzyjnych wyrażen z obszaru chemii, np. „możliwość łączenia układu 1,3-tiazyn z innymi substancjami”
- Pozycje literaturowe: 4 - Anisimov 2009 oraz 85 – Kubiak i wsp., 2014 nie są cytowane w tekście.

W podsumowaniu wyrażam, że Autor osiągnął postawione w rozprawie cele, a otrzymane wyniki, ich opracowanie oraz interpretacja odpowiadają w pełni oczekiwaniom w zakresie rozważań naukowych. Jest to wartościowe opracowanie, które dostarcza wiedzy na temat biologicznych właściwości nowych układów heterocyklicznych z podstawnikiem 2,4-dihydroksyfenylowym, zarówno na poziomie linii komórkowych jak i molekularnym. W związku z powyższym stwierdzam, iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Arkadiusza M. Czerwonki pt.: *„Ocena aktywności przeciwnowotworowej wybranych pochodnych 1,3-tiazyn w komórkowym modelu raka jelita grubego”* odpowiada warunkom określonym w Art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) *o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki*. W związku z tym wnioskuje do Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie pragnę podkreślić wysoki poziom naukowy, ponadprzeciętny wkład pracy w przeprowadzenie badań, znaczenie poruszanych problemów oraz istotne uzupełnienie stanu wiedzy, dlatego też wnioskuje do Wysokiej Rady o **wyróżnienie** ocenianej dysertacji.

prof. dr hab. Joanna Matysiak

Lublin, 09-06-2015 r.