

dr hab. n.med. Renata Perlikowska, prof. uczelni
Zakład Chemii Biomolekularnej
Wydział Lekarski
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, 18.04.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Anastazji Marii Poczty,

zatytułowanej

„Aktywność przeciwnowotworowa nowych pochodnych melfalanu w komórkach
białaczek szpikowych oraz szpiczaka mnogiego”

wykonanej w Katedrze Biofizyki Medycznej Instytutu Biofizyki na Wydziale Biologii
i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

W ostatnich dekadach obserwuje się zwiększoną zapadalność na nowotwory układu krwiotwórczego, przy jednoczesnej niewielkiej poprawie wskaźników przeżycia. Pomimo dość szerokiego wachlarza leków o różnych mechanizmach działania oraz dostosowanych do pacjenta strategii działania, leczenie pozostaje wciąż wyzwaniem. Standardem leczenia pierwszego rzutu chorych na szpiczaka mnogiego, którzy kwalifikują się do przeszczepu jest zastosowanie melfalanu w dużych dawkach, wraz z rezerwowym przeszczepem krwiotwórczych komórek macierzystych. Lek ten wykazuje silne działanie alkilujące, prowadząc do zmian strukturalnych materiału genetycznego skutkujących sieciowaniem DNA, powstawaniem monoadduktów oraz kompleksów DNA – białko. Nieprawidłowości te zakłócają lub hamują replikację i transkrypcję DNA, blokują cykl komórkowy i prowadzą do śmierci komórki. Niestety stosowanie melfalanu, podobnie jak innych leków hamujących podziały komórkowe, wiąże się z ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych, w tym hamowania czynności krwiotwórczej szpiku kostnego. Obok kardiotoxyczności, mielosupresji, niewydolności nerek, zmian w obrębie tkanki płuc, osłabienia działania układu odpornościowego, wymienia się również duże ryzyko występowania wtórnych nowotworów, w tym ostrych białaczek, a także pojawienie się oporności wielolekowej. Obecnie w wielu ośrodkach naukowych prowadzi się intensywne poszukiwania nowych metod terapeutycznych o wysokiej skuteczności przeciwnowotworowej oraz lepszym profilu bezpieczeństwa.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska poświęcona jest próbie znalezienia nowych związków opartych na strukturze cząsteczki melfalanu, które wykazałyby zwiększoną aktywność przeciwnowotworową i jednocześnie zmniejszone ryzyko działań

niepożądanych w porównaniu do związku macierzystego. W świetle powyższych danych, tematyka przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej mgr Anastazji Marii Poczty wykonanej pod kierunkiem Pani Promotor prof. dr hab. Agnieszki Marczak z Katedry Biofizyki Medycznej, Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego oraz Pana Promotora pomocniczego dr. inż. Piotra Krzeczyńskiego z Sieci Badawczej Łukasiewicz–Instytut Chemii Przemysłowej im. prof. I. Mościckiego w Warszawie, jest bardzo aktualna i wychodzi naprzeciw zapotrzebowaniu lekarzy onkologów na pojawienie się nowych leków, poprawiających rokowanie w leczeniu nowotworów układu krwiotwórczego.

Celem nadrzędnym niniejszej rozprawy doktorskiej była synteza nowych pochodnych melfalanu zmodyfikowanych w obrębie grupy karboksylowej oraz aminowej, a także analiza ich właściwości biologicznych względem komórek szpiczaka mnogiego (RPMI8226) oraz komórek ostrej białaczki monocytowej (THP1) i promielocytowej (HL60).

Rozprawa doktorska Pani mgr Anastazji Marii Poczty została przedstawiona w postaci cyklu opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, co spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami). Cykl prac stanowiący podstawę postępowania doktorskiego, składa się z czterech publikacji (jednej przeglądowej oraz trzech oryginalnych), w trzech Doktorantka jest pierwszym autorem i jednocześnie autorem korespondencyjnym. Ponadto zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami współautorów, Pani mgr Anastazja Maria Poczta miała wiodący udział w przygotowaniu omawianych publikacji. We wszystkich pracach Doktorantka zarówno projektowała jak i wykonywała doświadczenia, analizowała wyniki, przygotowywała manuskrypt, poszukiwała i opracowywała bibliografię, co świadczy o bardzo dużym zaangażowaniu i samodzielności Autorki. Podkreślić należy, że wszystkie prace składające się na cykl zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR o wysokich współczynnikach wpływu oraz dużej liczbie punktów MNiSW. Sumaryczna wartość współczynnika IF dla omawianych prac wyniosła 21.759.

Układ rozprawy doktorskiej Pani mgr Anastazji Marii Poczty jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań, uwagę zwraca duża syntetyczność i przejrzystość, co wynika z właściwie przyjętej koncepcji przygotowania rozprawy. Przedstawiona do oceny praca doktorska zawiera 152 strony, z czego 33 strony stanowią autoreferat; jest podzielona na osiem rozdziałów, w tym (1) finansowanie, (2) współpraca naukowa, (3) spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, (4) wprowadzenie, (5) omówienie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, (6) wnioski, (7 i 8) streszczenie w języku polskim i angielskim. Zwarte merytorycznie wprowadzenie złożone jest z pięciu podrozdziałów: (4.1) uzasadnienia podjętej tematyki, (4.2) hipotezy, (4.3) celu głównego,

(4.4) celów szczegółowych, (4.5) materiałów i metod badawczych. Wykaz bibliografii obejmuje 53 pozycje piśmiennicze, uszeregowane zgodnie z kolejnością cytowań.

W części wprowadzającej Pani mgr Anastazja Maria Poczta zwięźle i rzeczowo nakreśliła problematykę nowotworów układu krwiotwórczego, skupiając się na roli powszechnie stosowanego w chemioterapii melfalanu. Natomiast bardzo rzetelny opis obowiązujących standardów leczenia szpiczaka mnogiego, wraz z kompleksową charakterystyką melfalanu, zestawieniem badań klinicznych oceniających skuteczność terapii z jego zastosowaniem oraz wykaz metod modyfikacji chemicznych sprzyjających poprawie profilu farmakokinetycznego melfalanu znajduje się w pracy przeglądowej „*Treatment of Multiple Myeloma and the Role of Melphalan in the Era of Modern Therapies–Current Research and Clinical Approaches*” opublikowanej w 2021 w *Journal of Clinical Medicine* (IF: 4.964), wchodzącej w skład cyklu publikacji stanowiącego podstawę pracy doktorskiej.

Hipoteza, cel główny oraz cele szczegółowe pracy badawczej opisane zostały w sposób wyczerpujący i klarowny. Doktorantka wymieniła zastosowane materiały i metody badawcze, w tym scharakteryzowała linie komórkowe wykorzystane w badaniach (prawidłowe i nowotworowe), wymieniła nazwy oraz przedstawiła struktury chemiczne badanych pochodnych melfalanu, z wyszczególnieniem zastosowanych modyfikacji. Należy zwrócić uwagę na szeroki panel technik badawczych wykorzystany w pracy. Z opisu rozprawy, treści oświadczeń współautorów i szacunkowego wkładu Doktorantki w powstanie prezentowanych artykułów wynika, że Autorka bardzo dobrze opanowała wiele różnych technik eksperymentalnych i ma duże doświadczenie w planowaniu i prowadzeniu badań.

W kolejnym rozdziale Pani mgr Anastazja Maria Poczta przedłożyła opis publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej, omówiła szczegółowo strategię i metody badawcze, wraz z opisem uzyskanych wyników i wniosków.

Pierwszą z cyklu publikacji jest wspomniana przeze mnie praca przeglądowa pt. „*Treatment of Multiple Myeloma and the Role of Melphalan in the Era of Modern Therapies–Current Research and Clinical Approaches*” opublikowana w 2021 w *Journal of Clinical Medicine*, która stanowi kompetentnie i przejrzysto ujęty przegląd prac naukowych, dotyczących melfalanu, jego zastosowania oraz możliwych modyfikacji chemicznych jego struktury, umożliwiających opracowanie nowego leku o lepszych właściwościach terapeutycznych. Zaprezentowany przegląd prac naukowych, stanowi wyczerpujące opracowanie, oparte na 143 pozycjach piśmienniczych w przeważającej ilości z ostatniej dekady i niewątpliwie stanowi podstawę teoretyczną do projektowania nowych analogów melfalanu, planowania doświadczeń i ich walidacji. Wysoka jakość pracy przeglądowej wskazuje na dużą wiedzę Doktorantki i zainteresowanie tematem.

W kolejnej pracy zatytułowanej „*Chemical modification of melphalan as a key to improving treatment of haematological malignancies*” opublikowanej w roku 2020 w Scientific Reports (IF: 4.379) Pani mgr Anastazja Maria Poczta opisała badania nad serią 8 analogów melfalanu, zmodyfikowanych w obrębie grupy karboksylowej i/lub aminowej. Wybór tego typu modyfikacji był poparty danymi literaturowymi oraz wcześniejszymi rezultatami badań przeprowadzonych w zespole Pani prof. dr hab. Agnieszki Marczak. Co więcej, synteza otrzymanych pochodnych objęta została ochroną patentową PL220880 B1. W pierwszym etapie badań, Doktorantka wyselekcjonowała związki, które wykazały wyższą cytotoksyczność, genotoksyczność oraz właściwości proapoptotyczne względem komórek nowotworowych niż związek macierzysty. Szczególnie pochodna EM–MOR–MEL, będąca estrem melfalanu zmodyfikowanym dodatkowo pierścieniem morfolinowym z dwoma heteroatomami, tlenu i azotu, charakteryzowała się wysokim potencjałem cytotoksycznym wobec komórek nowotworowych, przy jednocześnie niskiej cytotoksyczności względem komórek prawidłowych. Wnioski wysunięte przez Doktorantkę, wskazują, że modyfikacja grupy karboksylowej poprzez jej estryfikację oraz zamiana grupy di–N–propyloaminowej na amidynową zawierającą pierścień morfolinowy, stanowią najkorzystniejszą zmianę w obrębie struktury melfalanu (EE–MOR–MEL i EM–MOR–MEL), powodującą wzrost cytotoksyczności i fragmentacji DNA. Podobne obserwacje dotyczyły własności proapoptotycznych badanych analogów, aczkolwiek mechanizm działania był różny w zależności od rodzaju zastosowanych komórek nowotworowych. Doktorantka zwróciła uwagę na dominację mitochondrialnego szlaku apoptozy w komórkach białaczkowych (THP1 i HL60), natomiast w przypadku komórek szpiczaka mnogiego wskazała na udział innych mechanizmów śmierci komórek.

Dalsze wyniki badań z zastosowaniem pochodnych melfalanu, Doktorantka opublikowała w roku 2022 na łamach czasopisma International Journal of Molecular Sciences (IF: 6.208), pt. „*Synthesis and In Vitro Activity of Novel Melphalan Analogs in Hematological Malignancy Cells*”. Kolejna seria związków, otrzymanych we współpracy z Siecią Badawczą Łukasiewicz–Instytut Chemii Przemysłowej w Warszawie pod kierownictwem Pana dr inż. Piotra Krzeczyńskiego, stanowiła pochodne estrów metylowych melfalanu podstawione w grupie amidynowej tiomorfoliną (EM–T–MEL), indoliną (EM–I–MEL) oraz 4–(4–morfolinylo)piperidyną (EM–MORPIP–MEL). W tym przypadku, oprócz oceny właściwości cytotoksycznych, genotoksycznych oraz proapoptotycznych, Doktorantka przeprowadziła metodą *in silico* analizę ADMET (ang. Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity) badanych analogów, pozwalającą na określenie ich właściwości lekopodobnych (ang. drug – like). Spośród badanych analogów, najbardziej obiecującym związkiem była pochodna EM–T–MEL. Analog ten wykazał najwyższą cytotoksyczność

wobec komórek nowotworowych, wywołał wysoki poziom uszkodzeń DNA, aktywował markery apoptozy, spowodował szereg zmian biochemicznych m.in. spadek potencjału błony mitochondrialnej i aktywację kaspazy 3/7. Wysunięte przez Doktorantkę wnioski były zbieżne z rezultatami otrzymanymi wcześniej, otóż wzrost aktywności cytotoksycznej, genotoksycznej oraz proapoptotycznej analogów melfalanu wynikał z modyfikacji chemicznej melfalanu obejmującej estryfikację oraz zamianę grupy di-*N*-propyloaminowej na grupę amidynową, tym razem zawierającą resztę tiomorfolinową, która posiada atom azotu i siarki, odpowiednio w pozycji 1 i 4.

Ostatnia z cyklu praca opublikowana w roku 2022 na łamach czasopisma *International Journal of Molecular Sciences* (IF: 6.208), pt. „*Newly Synthesized Melphalan Analogs Induce DNA Damage and Mitotic Catastrophe in Hematological Malignant Cancer Cells*” przedstawia poszerzony zakres badań nad wyselekcjonowanymi we wcześniejszych etapach analogami melfalanu. Na podstawie badania struktury DNA metodą spektroskopii dichroizmu kołowego oraz analizy mechanizmów wewnątrzkomórkowych, Doktorantka wykazała, że głównym celem molekularnym dla melfalanu oraz badanych analogów jest DNA. Ponadto pochodne EM-MOR-MEL oraz EM-T-MEL, charakteryzujące się najlepszą aktywnością przeciwnowotworową w komórkach białaczkowych oraz szpiczaka mnogiego, miały wpływ na konformację struktury B-DNA, co skutkowało wzrostem poziomu ufosforylowanego histonu H2AX. Melfalan oraz jego pochodne wykazały zdolność do hamowania cyklu komórkowego w fazach S i G2/M, ze względu na swoje genotoksyczne działanie. Co więcej, badania potwierdziły, że aktywacja katastrofy mitotycznej, była przyczyną śmierci komórek szpiczaka mnogiego.

Rozprawę doktorską Pani mgr Anastazja Maria Poczta zakończyła jasno i przejrzyście napisanymi wnioskami, które odpowiadają postawionej hipotezie oraz celom pracy. Doktorantka zawarła w nich omówienie najważniejszych wyników z opublikowanych prac. Podkreśliła znaczenie modyfikacji chemicznych w obrębie grupy karboksylowej oraz di-*N*-propyloaminowej, które pozwoliły na otrzymanie pochodnych o lepszej aktywności cytotoksycznej, genotoksycznej i proapoptotycznej niż melfalan. Jednocześnie związki te były znacznie mniej cytotoksyczne wobec komórek prawidłowych. Rezultaty badań ujawniły również, że celem molekularnym melfalanu oraz jego analogów jest ich interakcja z DNA. Ponadto Pani mgr Anastazja Maria Poczta wskazała, że mechanizm aktywacji molekularnych szlaków śmierci przez melfalan oraz jego pochodne jest różny w zależności od rodzaju komórek nowotworowych. Wnioski wysunięte przez Doktorantkę mają w mojej ocenie bardzo ważny wymiar praktyczny i sugestie w nich zawarte stanowią bazę do dalszych poszukiwań.

W podsumowaniu stwierdzam, że cykl publikacji Pani mgr Anastazji Marii Poczty został prawidłowo zaplanowany i przedstawiony pod względem metodycznym. Wyniki są spójne z hipotezą badawczą i odpowiadają postawionym celom. Rozprawa Pani mgr Anastazji Marii Poczty napisana jest poprawnym językiem, praca jest estetyczna a rysunki przejrzyste. W tekście znalazłam kilka drobnych błędów literowych (strona 12 i 13) i edytorskich (strona 8 i 19). Uwagę zwraca również niejednakowa kolejność związków wymienionych w spisie w porównaniu z ich zestawieniem na Rysunku 1 (dotyczy to analogów EE-MEL i EM-MEL). Przy lekturze rozprawy doktorskiej Pani mgr Anastazji Marii Poczty nasuwają się też pewne pytania:

- Proszę o rozwinięcie myśli zawartej w stwierdzeniu: „Atom tlenu w tym pierścieniu zwiększa powinowactwo wiązania (...)”
- Krytycznym parametrem kandydatów na lek jest ich stabilność chemiczna, czy wobec tego analizowano stabilność otrzymanych analogów w osoczu?
- Jakie są dalsze kierunki badawcze, w których analogi melfalanu wyselekcjonowane dotychczas, mogłyby być wykorzystane?

Niniejsze uwagi, mają charakter marginalny i w niczym nie umniejszają wartości naukowej recenzowanej rozprawy.

Recenzowana praca napisana została w sposób wskazujący na dużą wiedzę teoretyczną i praktyczną Doktorantki. Badania zostały wykonane w ramach projektu „InterDOC-START –Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie” realizowanego na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego w latach 2018–2023 pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Marczak, Nr projektu: POWR.03.02.00–IP.08–00–DOK/16. Na uwagę zasługuje współpraca naukowa z Siecią Badawczą Łukasiewicz, w tym z Instytutem Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie przy współudziale dr inż. Małgorzaty Łukawskiej, oraz z Instytutem Chemii Przemysłowej im. prof. I. Mościckiego w Warszawie przy współudziale dr inż. Piotra Krzeczyńskiego. Dodatkowo, Pani Mgr Anastazja Maria Poczta odbyła 3-miesięczny staż naukowy w Friedrich – Alexander – Universität Erlangen – Nürnberg pod kierunkiem dr hab. n. med. Doroty Lubgan oraz Prof. Dr. Udo S. Gaipl.

Pani mgr Anastazja Maria Poczta wykazuje doskonale przygotowanie do dalszej pracy naukowej, a przedstawiona rozprawa pt. „Aktywność przeciwnowotworowa nowych pochodnych melfalanu w komórkach białaczek szpikowych oraz szpiczaka mnogiego” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. W związku z powyższym, przedstawiam Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego **wniosek o przyjęcie i dopuszczenie** Pani mgr Anastazji Marii Poczty **do dalszych etapów postępowania doktorskiego.**

Jednocześnie, z uwagi na rangę podjętej tematyki, kompetencje Doktorantki, nowatorski charakter prowadzonych badań, opublikowanie uzyskanych wyników w renomowanych czasopismach, fakt realizacji badań w międzynarodowym i interdyscyplinarnym zespole badawczym oraz znaczenie uzyskanych wyników dla rozwoju badań nad lekami o aktywności przeciwnowotworowej, zwracam się z wnioskiem do Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Anastazji Marii Poczty** zatytułowanej „Aktywność przeciwnowotworowa nowych pochodnych melfalanu w komórkach białaczek szpikowych oraz szpiczaka mnogiego”, wykonanej pod kierownictwem Pani prof. dr hab. Agnieszki Marczak oraz Pana dr. inż. Piotra Krzeczyńskiego.

Janeta Perlikówna