



Dr hab. inż. Dorota Bonarska-Kujawa
Katedra Fizyki i Biofizyki
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 28.04.2023

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Anastazji Marii Poczty pt. „Aktywność przeciwnowotworowa nowych pochodnych melfalanu w komórkach białaczek szpikowych oraz szpiczaka mnogiego”.

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem pani promotor prof. dr hab. Agnieszki Marczak w Katedrze Biofizyki Medycznej, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego oraz przy współpracy z Siecią Badawczą Łukasiewicz - Instytutem Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie pod opieką pana dr inż. Piotra Krzeczyńskiego, w charakterze promotora pomocniczego. Badania zrealizowane w ramach pracy doktorskiej były finansowane w ramach projektu „InterDOC-STARt-Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie” realizowanego na WBIOS UŁ w latach 2018-2023 pod kierunkiem pani prof. dr hab. Agnieszki Marczak (nr projektu: POWR.03.02.00-IP.08-00-DOK/16). Pani mgr Anastazja Poczta realizowała badania przedstawione w dysertacji również we współpracy z Instytutem Biotechnologii i Antybiotyków z Sieci Badawczej Łukasiewicz w Warszawie oraz w ramach 3 miesięcznego stażu naukowego we Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg w Niemczech.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy bardzo ważnego zagadnienia związanego z poszukiwaniem nowych i skutecznych metod terapii nowotworów układu krwiotwórczego, o złożonej patogenezie, wśród których duży odsetek stanowią ostra białaczka szpikowa oraz szpiczak mnogi. Na przestrzeni szeregu lat opracowano różnorodne schematy leczenia tych nowotworów, które w zależności od fazy rozwoju choroby opierają się na różnych mechanizmach działania ukierunkowanego na cel, jakim jest powstrzymanie namnażania się komórek nowotworowych oraz ich uśmiercenie. Wśród mechanizmów działania stosowanych w tym celu leków można wymienić: alkilację, immunomodulację, inhibicję deacetylazy histonowej czy zastosowanie przeciwciał monoklonalnych. Standardową procedurą stosowaną w leczeniu szpiczaka mnogiego jest terapia dużymi dawkami melfalanu wspomagana przeszczepem komórek macierzystych, stosowana u pacjentów zakwalifikowanych do przeszczepu. Jednak melfalan w dużych dawkach niszczy również zdrowe komórki krwiotwórcze, więc takie leczenie wymaga wcześniejszego pobrania tych komórek od pacjenta z krwi obwodowej, ich przechowywanie i przeszczep



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

po podaniu melfalanu (autologiczny przeszczep komórek macierzystych, ASCT). Ta terapia wiąże się ze znaczną toksycznością i dlatego może być stosowana głównie u pacjentów młodszych, nie dotkniętych istotnymi chorobami towarzyszącymi, nowo zdiagnozowanych i kwalifikujących się do przeszczepu. Terapię tą charakteryzuje ponadto brak selektywności, wysoka toksyczność dla komórek układu odpornościowego, częste występowanie w trakcie leczenia oporności wielolekowej (MDR) oraz ryzyko wystąpienia nowotworów wtórnych, a także inne skutki uboczne tj.: kardiotoxycznosc, hepatotoksyznosc, mielosupresja, niewydolność nerek oraz zmiany w tkance płucnej.

Współczesna medycyna onkologiczna, mimo rosnącego postępu w tej dziedzinie, nie jest w stanie aktualnie zaproponować skuteczniejszej i bezpieczniejszej terapii w leczeniu tych nowotworów. Obecnie trwają badania, które skupiają się na znalezieniu równie skutecznych leków w zwalczaniu nowotworów, ale o obniżonej cytotoxycznosci w odniesieniu do niezmiennych komórek i jednocześnie nieindukujących oporności wielolekowej organizmu. Substancji tych poszukuje się zarówno na drodze syntezy nowych związków, jak i na drodze modyfikacji leków już istniejących, o sprawdzonej aktywności farmakologicznej. Modyfikacja struktury chemicznej znanego leku oraz określenie molekularnego mechanizmu jego działania poprzez wyznaczenie związku pomiędzy jego budową i aktywnością przeciwnowotworową, stanowią podstawę do opracowania nowych leków o optymalnych właściwościach. Największe szanse powodzenia na znalezienie skutecznego leku ma zaplanowane działanie, które obejmuje kolejne następujące po sobie etapy, jakimi są: celowe zaprojektowanie leku, jego synteza oraz określenie aktywności w szerokim zakresie badań in vitro. Takie działanie pozwala na wybór najbardziej aktywnych związków i preselekcję nowych obiecujących substancji do dalszych badań przedklinicznych i klinicznych.

W przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej pani mgr Anastazja Poczta podjęła się zatem istotnego dla medycyny onkologicznej zadania, dotyczącego zaprojektowania i wyłonienia potencjalnych leków spośród 11 otrzymanych na drodze syntezy pochodnych melfalanu, które będą bardziej skuteczne w leczeniu nowotworów, jednak bezpieczniejsze dla organizmu. Doktorantka podjęła się także próby określenia mechanizmów leżących u podstaw cytotoxycznego działania tych związków oraz ścieżki odpowiedzialnej za indukowanie przez nie śmierci komórkowej w odniesieniu do komórek szpiczaka mnogiego (RPMI8226), ostrej białaczki promielocytowej (HL60) oraz ostrej białaczki monocytowej (THP1). Badania zostały przeprowadzone również wobec jednojądrzastych komórek prawidłowych krwi obwodowej. Takie badania nie zostały do tej pory przeprowadzone, a ich podjęcie jest ważne i w pełni uzasadnione oraz stanowi o oryginalności rozwiązania problemu naukowego.

KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

Rozprawę doktorską stanowi cykl spójnych tematycznie czterech publikacji, w tym jednej pracy przeglądowej i 3 doświadczalnych, dotyczących toksycznego działania melfalanu i jego pochodnych, a także mechanizmów ich działania w odniesieniu do komórek szpiczaka mnogiego, ostrej białaczki monocytowej i promielocytowej. Prace te zostały opublikowane w czasopismach z bazy *Journal Citation Reports* o zasięgu międzynarodowym. W skład rozprawy doktorskiej wchodzi następujące prace:

1. Poczta A., Rogalska A., Marczak A.; *Treatment of Multiple Myeloma and the Role of Melphalan in the Era of Modern Therapies—Current Research and Clinical Approaches*; J Clin Med; 2021;10(9):1841,
2. Gajek A., Poczta A., Łukawska M., Cecuda-Adamczewska V., Tobiasz J., Marczak A.; *Chemical modification of melphalan as a key to improving treatment of haematological malignancies*. Sci Rep; 2020, 10: 4479,
3. Poczta A., Krzeczyński P., Tobiasz J., Rogalska A., Gajek A., Marczak A.; *Synthesis and In Vitro Activity of Novel Melphalan Analogs in Hematological Malignancy Cells*. Int. J. Mol. Sci. 2022; 23:1760,
4. Poczta A., Krzeczyński P., Ionov M., Rogalska A., Gajek A., Marczak A., Lubgan D.; *Newly Synthesized Melphalan Analogs Induce DNA Damage and Mitotic Catastrophe in Hematological Malignant Cancer Cells*; Int. J. Mol. Sci.2022; 23:14258.

Warto podkreślić, że sumaryczna wartość IF publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi zgodnie z rokiem opublikowania 21.759 oraz 560 punktów MEiN.

Do rozprawy doktorskiej zostały również dołączone pisemne oświadczenia współautorów wyżej wymienionych prac o ich udziale procentowym w poszczególnych publikacjach. Zgodnie z oświadczeniami współautorów procentowy udział Doktorantki w poszczególnych pracach jest dominujący i stanowi odpowiednio 80, 40, 55 i 60 %. Ponadto z oświadczeń współautorów prac wynika, że pani mgr Poczta uczestniczyła aktywnie na każdym etapie planowania i wykonywania badań, które następnie potrafiła opracować i opisać w formie publikacji. W drugiej pracy Doktorantka jest drugim autorem (równoważnym z pierwszym), a w pozostałych pracach pierwszym. W pracach 1, 3 i 4 pełniła również rolę autora korespondencyjnego.

Układ rozprawy doktorskiej mgr Poczty jest klasyczny i w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim. Dysertację stanowią następujące rozdziały: finansowanie (1), współpraca naukowa (2), spis publikacji, wchodzących w skład rozprawy (3), wprowadzenie (4), omówienie prac wchodzących



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

w skład rozprawy (5), wnioski (6), streszczenie rozprawy w języku polskim (7) i angielskim (8) oraz kopie prac i oświadczenia współautorów.

W rozdziale czwartym Doktorantka krótko, rzeczowo i przejrzysto opisała w pięciu podrozdziałach wprowadzenie do rozprawy doktorskiej poprzez: uzasadnienie podjętej tematyki badań (1), sformułowanie hipotezy badawczej (2), celu głównego (3) i celów szczegółowych pracy (4), a także podając informacje o materiałach oraz metodach badawczych (5). W uzasadnieniu podjęcia tematu rozprawy pani mgr Anastazja Poczta w sposób syntetyczny zarysowała problematykę związaną z leczeniem nowotworów układu krwiotwórczego oraz kierunkami poszukiwań nowych skutecznych leków możliwych do zastosowania w ich terapii, na podstawie 53 doniesień literaturowych opublikowanych głównie w latach 2010-2022.

Doktorantka w hipotezie badawczej sformułowanej w podrozdziale 4.2 na str. 8 założyła, że zastosowane modyfikacje struktury melfalanu w grupie karboksylowej i amidynowej zwiększą aktywność przeciwnowotworową macierzystego związku. Głównym celem badawczym pracy doktorskiej sformułowanym przez mgr Poczta, była analiza właściwości biologicznych nowosyntetyzowanych pochodnych melfalanu oraz wyłonienie wśród tej grupy struktur o wyższej aktywności przeciwnowotworowej wobec komórek szpiczaka mnogiego, ostrej białaczki monocytowej i promielocytowej. Jako szczegółowe cele badawcze doktorantka wymieniła: opracowanie syntezy nowych pochodnych melfalanu, przeprowadzenie metodą *in silico* analizy ADMET określającą ich właściwości lekopodobne, analizę cytotoksyczności związków względem komórek nowotworowych i prawidłowych, analizę genotoksyczności związków wobec komórek nowotworowych, ocenę ich zdolności do indukowania programowanej śmierci komórkowej, a także określenie głównych mechanizmów odpowiedzialnych za ich aktywność biologiczną i analizę wpływu związków na strukturę DNA komórek nowotworów.

Następnie przedstawiła wybrany materiał badawczy, jaki stanowiły linie komórkowe: szpiczaka mnogiego, ostrej białaczki monocytowej i promielocytowej, do których stosuje się terapię melfalanem, jak również prawidłowe komórki jednojądrzaste krwi obwodowej. Doktorantka do badań wybrała w sumie 11 zaprojektowanych analogów melfalanu, z podstawnikami w grupie karboksylowej i amidynowej, o potencjale leków przeciwnowotworowych o wyższej skuteczności i mniejszej szkodliwości dla komórek prawidłowych.

W piątym podrozdziale wprowadzenia pani mgr Poczta wymieniła zastosowane metody badawcze zarówno w pierwszym etapie badań syntezy i analizy struktury nowych pochodnych melfalanu, jak i na II etapie w testach cytotoksyczności, genotoksyczności i analizie mechanizmów molekularnych w aktywności



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

przeciwnowotworowej wykonanych dla wybranych związków. Ilość metod i technik badawczych wykorzystanych w badaniach oraz umiejętność korzystania z narzędzi *in silico* typu analiza ADMET oraz QSAR zasługuje na podkreślenie i uznanie dla umiejętności i dojrzałości naukowej Doktorantki, świadomej celu wykonywanych badań.

W rozdziale 5 Doktorantka omówiła prace wchodzące w skład dysertacji. Warto dodać, że przedstawiona do oceny seria publikacji, stanowi spójny tematycznie i szczegółowo zaplanowany oraz zrealizowany cykl ciekawych badań. Ich tematem przewodnim jest: Aktywność przeciwnowotworowa nowych pochodnych melfalanu w komórkach białaczek szpikowych oraz szpiczaka mnogiego. Całość cyklu otwiera pierwsza publikacja przeglądowa szeroko omawiająca na podstawie aż 143 publikacji stan wiedzy na temat zastosowania melfalanu i jego analogów w terapii nowotworów układu krwiotwórczego. Tak rzetelne podejście do oceny stanu wiedzy zasługuje na najwyższe uznanie i stanowi solidną podstawę do dalszych poszukiwań nowych skuteczniejszych związków. Pani mgr Anastazja Poczta w kolejnych pracach doświadczalnych przedstawiła wyniki badań przeprowadzonych nad nowosyntetyzowanymi analogami melfalanu i mechanizmami ich działania. W pracy drugiej omówiła szczegółowo pierwszy etap badań, w którym na podstawie analizy danych literaturowych oraz wcześniejszych badań zespołu prof. Agnieszki Marczak zaprojektowała 8 nowych związków pochodnych melfalanu z podstawnikami w grupie amidynowej i karboksylowej, które zostały opatentowane i przeanalizowane *in silico* pod kątem właściwości fizykochemicznych i lekopodobnych. Następnie przeprowadzone badania cytotoksyczności, genotoksyczności na poziomie uszkodzeń DNA oraz aktywności proapoptycznej tych związków przeprowadzone wobec linii komórek nowotworowych oraz dla komórek prawidłowych pozwoliły wyłonić najbardziej obiecujące pochodne melfalanu do dalszych etapów badań. Zostały również dobrane stężenia przypadające na poszczególne linie komórkowe na podstawie krzywych przeżywalności, które nie zostały przytoczone. Jeśli to możliwe prosiłabym Doktorantkę o przedstawienie wyników i uzasadnienie dokonanego wyboru stężeń.

Korzystając z wiedzy uzyskanej na pierwszym etapie badań zostały zaprojektowane i zsyntetyzowane kolejne 3 pochodne melfalanu: podstawione w grupie amidynowej tiomorfoliną (EM-T-MEL), indoliną (EM-I-MEL) oraz 4-(4-morfolino)piperidyną (EM-MORPIP-MEL), jakie przesłanki przemawiały za syntezą tych analogów melfalanu? Planowano również czwartą pochodną podstawioną tiazoliną, której synteza nie powiodła się, co mogło być tego przyczyną? Analiza ADMET pozwoliła na zakwalifikowanie tych związków do grupy związków lekopodobnych w 5 z 6 analizowanych właściwości. Z ciekawości naukowej proszę Doktorantkę o rozwinięcie wniosku z tej analizy: „Można przewidzieć, iż



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

badane związki nie będą biodostępne w zadowalającym stopniu w podaniu doustnym, zaleca się podanie dożylnie.” (str.20)

Wyniki z I i II etapu badań wyłoniły 5 pochodnych melfalanu, dla których wykonano badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów ich molekularnego hamowania proliferacji i indukujących śmierć komórek nowotworowych. Wyniki tych badań wykazały oddziaływanie analogów melfalanu z DNA skutkujących zatrzymaniem cyklu komórkowego i śmiercią komórek białaczkowych na szlaku apoptozy, a w przypadku szpiczaka mnogiego poprzez katastrofę mitotyczną.

W trakcie czytania tej części pracy nasunęła mi się jedyna sugestia, mianowicie zabrakło mi zestawienia wszystkich badanych związków oraz wyników ich aktywności potwierdzonej w tak wielu badaniach. Takie zestawienie ułatwiłoby czytanie tekstu bez konieczności szukania wyników w tekstach publikacji.

Poza tą niewielką niedogodnością ta część rozprawy doktorskiej została napisana bardzo przejrzysto i czytelnie, podobnie jak prace wchodzące w skład dysertacji. Doktorantka precyzyjnie, konsekwentnie i logicznie przeprowadziła kolejne etapy prowadzonych przez siebie badań, formułując wnioski po każdym z nich i przeprowadzając rzeczową analizę uzyskanych wyników. Na szczególną uwagę w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej zasługuje bogaty i precyzyjnie zaplanowany, pod kątem realizacji celu pracy, warsztat badawczy Doktorantki. Pani mgr Anastazja Pocza wykonała różnymi i umiejętnie dobranymi, nowoczesnymi metodami fizycznymi i analitycznymi, charakterystycznymi dla celowego projektowania leków, szereg badań i oznaczeń na liniach komórkowych indukowanych badanymi związkami. Są to badania i oznaczenia: cytotoksyczności, fragmentacji DNA, frakcji komórek nekrotycznych i apoptotycznych, zaburzeń struktury błony komórkowej, analizy kondensacji chromatyny, zmian potencjałów mitochondrialnych, poziomu wapnia, analizy kaspaz, struktury DNA, potencjału zeta, zmian w cyklu komórkowym, a także analiza *in silico* ADMET i QSAR oraz metody chromatograficzne i spektroskopowe stosowane w syntezie chemicznej potwierdzające strukturę związków. Na uwagę zasługuje duża różnorodność wykonanych przez Doktorantkę badań z wykorzystaniem fluorescencyjnych technik badawczych: cytometrii przepływowej, spektroskopii i mikroskopii przy użyciu szeregu znaczników fluorescencyjnych oraz techniki DLS, dichroizmu kołowego i szeregu testów biochemicznych. Umiejętność wnikliwej analizy przeprowadzonych eksperymentów pozwoliła Doktorantce w pełni zrealizować cel badań, a ich szerokie spektrum zasługuje na uznanie i świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki oraz umiejętności celowego i analitycznego prowadzenia samodzielnej pracy naukowej.



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

Na podstawie uzyskanych wyników pani mgr Anastazja Poczta sformułowała interesujące wnioski oraz pozytywnie zweryfikowała postawioną hipotezę badawczą. Stanowią one w mojej ocenie oryginalne osiągnięcie Doktorantki, gdyż zawierają ważne i nowe aspekty poznawcze dotyczące aktywności cytotoksycznej wybranych, nowych pochodnych melfalanu w odniesieniu do komórek szpiczaka mnogiego (RPMI8226), ostrej białaczki promielocytowej (HL60) oraz ostrej białaczki monocytowej (THP1). Doktorantka przyjęła słuszną strategię modyfikacji grupy karboksylowej melfalanu poprzez jej estryfikację oraz grupy amidynowej poprzez podstawienie jej grupą amidynową z pierścieniem morfoliniowym lub tiomorfoliniowym. Nowe związki wykazały się lepszą aktywnością cytotoksyczną i proapoptotyczną w komórkach nowotworów, ale były też mniej toksyczne dla komórek prawidłowych. Doktorantka określiła ponadto molekularny mechanizm szlaków śmierci komórek białaczkowych poprzez aktywację szlaku apoptotycznego (mitochondrialnego i receptorowego) oraz poprzez inicjację katastrofy mitotycznej u szpiczaka mnogiego. Ze względu na obiecujące w aspekcie aplikacyjnym wyniki mam pytanie do pani mgr Poczty, czy ma w planach kontynuację badań i/lub włączenia się np. w badania przedkliniczne/kliniczne nad skutecznością badanych przez nią analogów melfalanu *in vivo*?

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską pani mgr Anastazji Poczty. Na jej dużą wartość merytoryczną składają się umiejętnie zaplanowane i przeprowadzone badania opublikowane w renomowanych czasopismach, które dotyczą aktualnego i bardzo ważnego problemu, jakim jest skuteczna terapia nowotworów, ratująca ludzkie życie. Doktorantka wykazała się przy tym dużymi umiejętnościami samodzielnego prowadzenia badań eksperymentalnych oraz znajomością problematyki z zakresu farmakologii, chemii leków, cytobiologii, biochemii i biofizyki. W swojej rozprawie przedstawiła oryginalne i bardzo ciekawe badania, które mają charakter nowatorski i poznawczy, z dużym potencjałem aplikacyjnym. Rozprawa doktorska pani mgr Anastazji Poczty spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 roku. Uważam, że przedłożona mi do oceny rozprawa jest podstawą do nadania Doktorantce stopnia naukowego Doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Zwracam się więc z uprzejmą prośbą do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Anastazji Marii Poczty do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Biorąc pod uwagę niezwykle bogaty dorobek naukowy Doktorantki, zakres i jakość przeprowadzonych przez nią badań, zwracam się z wnioskiem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o wyróżnienie rozprawy doktorskiej i stosowne nagrodzenie Doktorantki.



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie pracy

Praca doktorska Pani mgr Anastazji Poczty wyróżnia z kilku ważnych powodów. Przede wszystkim na uznanie zasługuje poziom merytoryczny rozprawy prezentującej bardzo nowoczesne, dobrze przemyślane i zaplanowane badania nad celowanym poszukiwaniem nowego leku przeciw nowotworom układu krwiotwórczego. Związki najpierw zostały zaprojektowane, zgodnie z dostępną wiedzą, zsyntetyzowane, co zostało udokumentowane dla części badanych związków w patencie PL220880 oraz przetestowane w badaniach *in vitro*, a także został zaproponowany molekularny mechanizm ich działania. Zaplanowane przez Doktorantkę związki zgodnie z hipotezą badawczą wykazały się większą cytotoksycznością wobec komórek nowotworów, zaś mniejszą wobec komórek prawidłowych w badaniach *in vitro* niż związek macierzysty melfalan, co jest zgodne z nowoczesną strategią poszukiwania nowych leków. W związku z tym nowe związki mają duży potencjał aplikacyjny po wykonaniu testów przedklinicznych i klinicznych *in vivo*. Uzyskane wyniki są zatem bardzo obiecujące dla medycyny onkologicznej w poszukiwaniu nowych strategii w terapiach nowotworów szpiku kostnego. Praca ponadto wyróżnia się niezwykle bogatym warsztatem badawczym zastosowanym do oceny przydatności nowych związków w terapii nowotworów białaczek monocytowej i polimielocetowej oraz szpiczaka mnogiego, co świadczy o dużej wiedzy i wyjątkowych umiejętnościach do prowadzenia nowatorskich i celowych eksperymentów przez Doktorantkę. Ponadto na wyróżnienie zasługuje również cykl publikacji stanowiący rozprawę doktorską, w którym każda z prac posiada 140 punktów MiEN oraz wysoki IF z przedziału 4,379-6,208, a Doktorantka wykazała swój dominujący wkład w ich powstawanie.

Dr hab. inż. Dorota Bonarska-Kujawa