

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Karola Bukowskiego pt „Aktywność przeciwnowotworowa nowych trójcyklicznych pochodnych układu pirazolo[4,3-e][1,5-b] [1,2,4]triazyny w komórkach linii nowotworowych człowieka”

Praca wykonana w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Genetyki, Instytutu Biologii Eksperymentalnej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Renaty Kontek, prof. Uł (promotor) oraz dr Beaty Marciniak (promotor pomocniczy)

Opracowywanie skutecznej terapii przeciwnowotworowej jest zagadnieniem, które od lat zajmuje naukowców na całym świecie. Niestety pomimo ogromnego nakładu sił i środków problem walki z chorobą nowotworową nie został rozwiązany a poszukiwanie nowych związków chemicznych, które okazałyby się bardziej skuteczne od tych wykorzystywanych w terapii jest wciąż aktualnym tematem wielu badań naukowych. W nurt tej problematyki wpisują się również badania prowadzone przez mgr. Karola Bukowskiego, będące przedmiotem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej a uzyskane przez niego wyniki niosą informację, która może w przyszłości znaleźć zastosowanie w praktyce.

Rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o spójny tematycznie zestaw publikacji – jedna praca przeglądowa oraz dwie prace eksperymentalne. Prace zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o wysokim współczynniku oddziaływania mieszczącym się w przedziale IF od 4,9 do 6,2 a i posiadających 140 punktów MEiN każda. Na uwagę zasługuje fakt, że praca przeglądowa opublikowana w 2020 roku był już cytowana ponad 450 razy co świadczy o tym jak ważnego i budzącego duże zainteresowanie tematu badawczego dotyczy rozprawa doktorska mgr. Karola Bukowskiego. We wszystkich trzech publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem a w dwóch (praca przeglądowa oraz praca opublikowana w *Molecules*) również autorem korespondującym. Dowodzi to istotnego wkładu mgr. Karola Bukowskiego w powstanie tych prac. Potwierdzają to oświadczenia współautorów dołączone do rozprawy, z których wynika, że udział Doktoranta w tworzeniu w/w publikacji wynosił 80% w przypadku pracy przeglądowej oraz 70% i 60% w pracach eksperymentalnych.

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi, oprócz załączonych publikacji stanowiących podstawę doktoratu i oświadczeń współautorów, autoreferat. Ta część rozprawy jest bardzo dobrze napisana. W sposób zwięzły ale wyczerpujący wprowadza czytelnika w tematykę prowadzonych badań. Prezentuje cel badań, którym była ocena w warunkach *in vitro* profilu aktywności przeciwnowotworowej trzech zsyntetyzowanych *de novo* pochodnych pirazolo[4,3-e]tetrazolo[1,5-b][1,2,4]triazyny oraz wytypowanie pochodnej o najsilniejszym działaniu przeciwnowotworowym. Cel jest jednoznaczny i nie budzi żadnych wątpliwości. Doktorant określił hipotezę badawczą, która pozwala na zapoznanie się ze spodziewanymi wynikami badań oraz sformułował szczegółowe cele odnoszące się bezpośrednio do realizowanych zadań badawczych czyli, i) zbadanie cytotoksyczności pochodnych triazyny, ii) określenie rodzaju uszkodzeń, którym podlegają komórki nowotworowe hodowane w obecności badanych związków, iii) ocenę przebiegu cyklu komórkowego oraz iv) analiza *in silico* zmierzająca do poznania molekularnego mechanizmu działania pochodnych. W autoreferacie mgr Karol Bukowski przedstawił podstawowy materiał biologiczny i chemiczny wykorzystywany w badaniach oraz wymienił metody, które posłużyły mu do zrealizowania zamierzonych celów. Bardzo pozytywnie oceniam fakt, że w badaniach właściwości przeciwnowotworowych pochodnych triazyny wykorzystano, oprócz 4 linii komórek nowotworowych różnego pochodzenia (rak szyjki macicy, rak

okrężnicy, rak prostaty, gruczolakorak trzustki), również komórki prawidłowe (komórki jednojądrzaste krwi oraz fibroblasty). W dalszej części autoreferatu Doktorant omawia skrótowo wyniki zaprezentowane w poszczególnych pracach eksperymentalnych jak również zapoznaje czytelnika z najważniejszymi informacjami zawartymi w pracy przeglądowej. Część wyników została przedstawiona w autoreferacie w formie czterech tabel, które wzbogacają dane zaprezentowane w omawianych publikacjach.

Pierwsza z publikacji wchodzących w zakres ocenianej rozprawy doktorskiej to praca przeglądowa Bukowski, K.; Kciuk, M.; Kontek, R. ***Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy.*** *International Journal of Molecular Sciences* 2020, 21, 3233, przedstawiająca w sposób kompleksowy molekularne mechanizmy leżące u podstaw oporności wielolekowej. W pracy zaprezentowany został również podział chemioterapeutyków ze względu na ich mechanizm działania. Mgr Karol Bukowiecki wraz ze współautorami słusznie konkluduje w publikacji, że ze względu na dużą różnorodność biologiczną nowotworów wpływającą na ich bardzo zróżnicowaną oporność na stosowane chemioterapeutyki najbardziej efektywną metodą ich leczenia jest terapia wykorzystująca więcej niż jeden lek, każdy o odmiennym mechanizmie działania. Biorąc powyższe pod uwagę poszukiwanie nowych, bardziej skutecznych chemioterapeutyków, które mogłyby być wykorzystywane w tego typu terapiach jest celem wielu prac badawczych w tym również tej, którą podjął się mgr. Karol Bukowiecki realizując swój projekt doktorski.

Kolejna praca (Bukowski, K.; Marciniak, B.; Kciuk, M.; Mojzych, M.; Kontek, R. ***Pyrazolo[4,3-*e*]tetrazolo[1,5-*b*][1,2,4]triazine Sulfonamides as Novel Potential Anticancer Agents: Cytotoxic and Genotoxic Activities In Vitro.*** *Molecules* 2022, 27, 3761.) stanowiąca podstawę ocenianej rozprawy doktorskiej prezentuje część wyników dotyczących badania cytotoksyczności i genotoksyczności trzech pochodnych pirazolo-triazyny (MM129, MM130 i MM131). Doktorant wykazał zróżnicowaną wrażliwość 4 linii komórek nowotworowych oraz komórek prawidłowych (fibroblastów i komórek jednojądrzastych krwi) na badane związki. Spośród komórek nowotworowych najbardziej wrażliwe okazały się komórki raka trzustki (linia BxPC-3) zaś najsilniejsze działanie cytotoksyczne wykazywał związek MM131. Ta sama pochodna miała najsilniejsze działanie genotoksyczne, co potwierdził test kometowy, przy czym najbardziej wrażliwe na powstające pod wpływem tej pochodnej uszkodzenia były komórki linii HCT116. Obecność dwuniciowych pęknięć DNA potwierdzono dodatkowo wykonując barwienie immunocytochemiczne identyfikujące skupiska ufosforylowanego histonu H2AX (γ H2AX) w obrębie jąder komórek linii HCT116.

Badania zaprezentowane w pracy opublikowanej w *Molecules* (2022) zostały rozwinięte i opisane w kolejnej publikacji - Bukowski, K.; Marciniak, B.; Kciuk, M.; Mujwar, S.; Mojzych, M.; Kontek, R. ***Pyrazolo[4,3-*e*]tetrazolo[1,5-*b*][1,2,4]triazine Sulfonamides as Novel Potential Anticancer Agents: Apoptosis, Oxidative Stress, and Cell Cycle Analysis.*** *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24, 8504. Mgr Karol Bukowski, przeprowadzając odpowiednie analizy wykazał, że podobnie jak w przypadku działania cytotoksycznego badanych pochodnych, również podatność na apoptozę indukowaną związkami MM jest różna dla różnych linii komórek nowotworowych. Najwyższą wrażliwością cechowały się komórki HeLa i HCT116 a najsilniejszy potencjał proapoptotyczny wykazywał związek MM129. W komórkach poddanych działaniu pochodnych MM stwierdzono spadek potencjału mitochondrialnego. Zaburzenie potencjału błony mitochondrialnej jest zjawiskiem, który towarzyszy apoptozie na wczesnych jej etapach (faza inicjacji). Co ciekawe obserwowany spadek $\Delta\Psi_m$ stwierdzono dopiero przy zastosowaniu wysokich stężeń badanych związków (dla większości linii komórkowych – 2xIC50). Cytometryczny pomiar wolnych rodników pozwolił również na wykazanie prooksydacyjnych właściwości badanych pochodnych, przy czym w tym przypadku MM131 wyraźnie wywierała najsilniejszy efekt podnosząc poziom RFT prawie dwukrotnie w porównaniu

do najsłabiej działającej pochodnej MM129. Ponadto analiza cyklu komórkowego dowiodła, że podanie związków MM zaburza proliferację komórek nowotworowych. Wynik tych badań został uzupełniony analizami *in silico* wskazującymi, że badane pochodne mogą zaburzać aktywność cyklinozależnych kinaz i w ten sposób przyczyniać się do obserwowanych zaburzeń cyklu komórkowego.

Wszystkie badania zostały bardzo dobrze zaplanowane i przeprowadzone pozwalając na zweryfikowanie hipotezy badawczej. Szczególnie doceniam fakt, że w większości badań zastosowano kilka stężeń związku, które były wyższe, równe lub niższe od określonego dla każdego związku i linii IC50. Ponadto część analiz wykonywano w dwóch punktach czasowych co pozwoliło na lepsze określenie dynamiki obserwowanych zmian i ich zależności od dawki. Wszystkie wyniki zostały prawidłowo zaprezentowane nie pozostawiając wątpliwości w jaki sposób uzyskiwano dane liczbowe przedstawione na wykresach. Ponadto wyniki zostały przeanalizowane z wykorzystaniem odpowiednich testów statystycznych.

Niezależnie od mojej wysokiej oceny badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej nasuwa mi się kilka pytań związanych głównie z interpretacją wyników w kontekście przeprowadzonych przez Doktoranta analiz:

1. Jakie jest tempo proliferacji poszczególnych linii komórkowych (np. czas podwojenia populacji) ? Czy wrażliwość na badane związki może wynikać z różnego tempa replikacji czy też jest jakaś inna prawdopodobna przyczyna zaobserwowanych różnic ?
2. Dlaczego silne uszkodzenia DNA zaobserwowane z wykorzystaniem testu kometowego w warunkach alkalicznych i neutralnych w komórkach HCT116 nie przekładają się na wysoką cytotoksyczność związków MM w stosunku do tej linii komórkowej ? Z kolei komórki HeLa, które były najmniej podatne na działanie genotoksyczne badanych związków wykazywały się największą podatnością na indukcję apoptozy ?
3. Czy Doktorant mógłby podjąć próbę wyjaśnienia dlaczego w przypadku komórek HeLa, które były najbardziej podatne na apoptozę (najwyższy odsetek komórek apoptotycznych), w teście MTT okazały się najmniej wrażliwe na działanie badanych związków. Z kolei komórki BxPC3, które były najbardziej wrażliwe na działanie badanych związków, były też najmniej podatne na apoptozę. To sugeruje, że inne procesy niż apoptoza mają wpływ na obserwowaną cytotoksyczność. Jakie to mogą być procesy, czy były badane ?
4. Badając właściwości prooksydacyjne związków MM stwierdzono znaczące różnice pomiędzy nimi. Podanie MM131 prowadziło do dwukrotnie wyższego poziomu ROS w porównaniu do MM129 (dla większości badanych linii). Z drugiej strony to właśnie MM129 miał najsilniejsze (lub w niektórych przypadkach porównywalne z pozostałymi badanymi związkami) działanie proapoptotyczne. Czy istnieje jakieś wyjaśnienie tej obserwacji ?
5. Czy badany był cykl komórkowy w późniejszych punktach czasowych ? Czy zaobserwowano jakieś różnice ?
6. Jak można wytłumaczyć brak wzrostu odsetka komórek we frakcji subG1 po podaniu badanych związków komórkom HeLa i HCT116 pomimo istotnego statystycznie wzrostu liczby komórek apoptotycznych ?
7. Komórki HeLa, które z wcześniejszych badań okazały się być najbardziej wrażliwe na działanie związków MM w przypadku analizy cyklu komórkowego nie wykazują w większości z badanymi wariantami zmian w cyklu komórkowym. O czym to może świadczyć ?



8. Na ile badane związki były bardziej efektywne od tych, które należą do tej samej grupy lub mają podobną budowę i są stosowane w terapii przeciwnowotworowej, czyli czy uzyskane pochodne są bardziej skuteczne od znanych i stosowanych ?

Wyniki przedstawione w publikacjach będących podstawą rozprawy doktorskiej zostały podsumowane w autoreferacie w schemacie, który nie jest dla mnie jednoznaczny. Prosiłabym o próbę wyjaśnienia jaką rolę odgrywają reaktywne formy tlenu w cytotoksycznym działaniu badanych związków ? Czy, biorąc pod uwagę budowę chemiczną badanych związków mogą one działać prooksydacyjnie ?

Ostatnia część autoreferatu przedstawia wnioski jakie zostały sformułowane w oparciu o wyniki przeprowadzonych badań. Są one w pełni uzasadnione i odpowiadają celom, które postawił sobie Doktorant rozpoczynając badania. Wnioski, które według mnie są szczególnie istotne z punktu widzenia przyszłych badań to stwierdzenie wyższej wrażliwości komórek nowotworowych niż prawidłowych na cytotoksyczne działanie badanych pochodnych oraz określenie pochodnej MM131 jako tej o najwyższej aktywności przeciwnowotworowej.

Wszystkie przedstawione powyżej uwagi i skierowane do Doktoranta pytania w żaden sposób nie wpływają negatywnie na moją wysoką ocenę przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej. Mgr Karol Bukowski w toku prowadzonych badań uzyskała bardzo dużo interesujących i oryginalnych wyników, które stanowią rzetelne podwaliny pod badania aplikacyjne.

Podsumowując, przeprowadzone w ramach projektu doktorskiego badania są dobrze uzasadnione i prawidłowo przeprowadzone. Ich wyniki niewątpliwie stanowią oryginalny wkład w badania podstawowe i aplikacyjne dotyczące poszukiwania związków o znaczącym potencjale terapeutycznym. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w stosownych ustawach. Zwracam się zatem z prośbą do Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Karola Bukowskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego.


Dr hab. Grażyna Mosieniak

Warszawa, 7.09.2023