

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice; tel. 32 278 9842; fax. 32 278 9757; e-mail: krawczyk@io.gliwice.pl

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. inż. Mateusza Psurskiego

„Nowe formułacje naturalnych izotiocyjanianów o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej”.

Izotiocyjaniany, związki bioaktywne występujące głównie w warzywach z rodziny krzyżowych, są od wielu lat przedmiotem zainteresowania jako potencjalne leki przeciwnowotworowe. Przekonanie, że prędzej czy później uda się wprowadzić któryś z licznej grupy tych związków, lub jakąś/jakieś pochodne do obrotu, opiera się zarówno na ludowych obserwacjach, jak również obecnych, naukowych badaniach populacyjnych sugerujących chemoprewencyjne działanie izotiocyjanianów. Równolegle prowadzone badania laboratoryjne potwierdzają, że izotiocyjaniany mogą hamować proliferację komórek, wykazując przy tym pewną preferencję w stosunku do komórek nowotworowych. Mimo silnych przesłanek, że związki pochodzenia roślinnego takie jak izotiocyjaniany, czy izoflawonoidy, mogłyby - z uwagi na ich plejotropowe działanie i brak lub niską ogólnoustrojową toksyczność - być stosowane jako leki uzupełniające w terapii skojarzonej, to na razie związki te są traktowane raczej jako suplementy diety. Zaleca się także, w celach profilaktycznych, zwiększenie udziału w diecie warzyw zawierających prekursorzy izotiocyjanianów.

Jedną z przyczyn, dla których izotiocyjaniany nie mają zastosowania w rutynowej terapii przeciwnowotworowej, może być – co podkreśla doktorant i z tego stwierdzenia wywodzi cel badań pracy doktorskiej - niedostateczna znajomość właściwości cytotoksycznych wszystkich znanych naturalnych izotiocyjanianów i koncentrowanie dotychczasowych badań na pogłębianiu wiedzy o właściwościach jedynie kilku związków tej grupy. Doktorant postanowił zatem sprawdzić czy wśród izotiocyjanianów, które dotychczas nie były przedmiotem systematycznych badań w kierunku ich potencjalnych właściwości antyproliferacyjnych, być może znajdują się związki o obiecujących właściwościach przeciwnowotworowych. Łącznie doktorant poddał wielokierunkowym badaniom niemal 90 związków (57 izotiocyjanianów i 38 pochodnych merkapturowych), z których kilka zakupił, natomiast większość zsyntetyzował opierając się na opublikowanych procedurach wprowadzając także własne modyfikacje. Związki, które ostatecznie doktorant badał pod względem ich cytotoksyczności, mieściły się w grupie aralkiloizotiocyjanianów, alkenoizotiocyjanianów, ω -(metylotio)alkiloizotiocyjanianów, ω -(metylosulfinylo)alkiloizotiocyjanianów, ω -(metylosulfonylo)alkiloizotiocyjanianów, hydroksyalkilo-izotiocyjanianów i (benzoiloksy)alkilo-izotiocyjanianów. Założenia syntezy i szczegółowy opis procedur syntetycznych i analitycznych zamieszczone są w podrozdziale

3.1. rozdziału „Wstęp” oraz w drugiej części rozdziału „Materiały i metody”. Ponieważ część chemiczna, jak można sądzić z opisu zawartego w pracy, stanowiła dla doktoranta bardziej problemem logistyczny i ewentualnie finansowy niż naukowy, i była jedynie etapem koniecznym do wykonania badań biologicznych, zatem w swojej ocenie skoncentruję się głównie na tym drugim aspekcie pracy doktorskiej.

Pierwszym etapem badań biologicznych była ocena cytotoksyczności wybranych związków poprzez wyznaczenie wartości IC50. Badania te prowadził doktorant na komórkach kilku linii nowotworowych (cztery ludzkie i dwie mysie). Aby jednocześnie ocenić, czy badane związki mogą przełamywać oporność wielolekową, doktorant włączył do badań komórki wrażliwe na doksorubicynę (linia LoVo), oraz sublinię LoVo/DX charakteryzującą się zwiększoną opornością na cytotoksyczne działanie tego antybiotyku. Jako związki referencyjne, doktorant wybrał rutynowo stosowane w terapii onkologicznej dwa cytostatyki, a mianowicie doksorubicynę (w badaniach prowadzonych na liniach LoVo i LoVo/DX) i cisplatinę (w badaniach prowadzonych na pozostałych liniach).

Badania wstępne miały charakter przesiewowy, a na podstawie ich wyników (przedstawionych w 8 tabelach) doktorant wybrał do dalszych badań funkcjonalnych i do oceny relacji struktury chemicznej związku i jego aktywności biologicznej tylko te związki, które wykazywały oczekiwane, bądź nowe, intrygujące cechy.

Analiza cytotoksyczności, wskazująca także potencjał antyproliferacyjny badanych izotiocyjanianów, wykazała, że żaden z badanych związków nie był w stosunku do komórek LoVo tak toksyczny jak doksorubicyna. To, co jednak okazało się zdumiewające i obiecujące, to to, że niektóre izotiocyjaniany hamowały proliferację komórek LoVo/DX wydajniej niż doksorubicyna. Takich związków w grupie aralkiloizotiocyjanianów było 9 [związki o numerach 2; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 26; spośród nich najsilniej działał związek 11 (izotiocyjanian 3,4-dimetoksybenzylowy], a w grupie kwasów merkapturowych odpowiadających związkom wymienionej grupy było 6 [pochodne o numerach N2; N5; N8; N10; N11; N26; spośród nich najsilniej działał związek N11. Dwa związki o podobnych jak wymienione wyżej właściwościach występowały w grupie hydroksyalkilo-izotiocyjanianów [związek 75] i (benzoiloksy)alkilo-izotiocyjanianów [związek 88] oraz ich pochodnych merkapturowych [związek N88]. Jeśli chodzi o izotiocyjaniany innych grup, to wśród nich znajdowało się kilka, których aktywność antyproliferacyjna była wobec komórek LoVo/DX interesująco zbliżona do aktywności doksorubicyny.

Jeśli chodzi o komórki, dla których jako referencyjny związek doktorant stosował cisplatinę, to wśród aralkiloizotiocyjanianów, hydroksyalkiloizotiocyjanianów, (benzoiloksy)alkiloizotiocyjanianów oraz odpowiadających im kwasów merkapturowych, znajduje się kilka związków o cytotoksyczności wyższej niż cisplatina i to w stosunku do komórek każdej z badanych linii, przy czym w większości przypadków także najefektywniej działał związek 11.

Powyższe obserwacje wyraźnie wskazują, że niektóre izotiocyjaniany lub ich pochodne, nie tylko mogą wykazywać *in vitro* efekt cytotoksyczny silniejszy niż klinicznie stosowane cytostatyki, ale co ważniejsze mogą przełamywać oporność wielolekową. Ta ostatnia obserwacja stoi jednak w sprzeczności - do czego odnosi się doktorant w rozdziale „Dyskusja” - z danymi innych badaczy. Ponieważ badania prowadzono na różnych liniach

nowotworowych odmienne wyniki mogą być spowodowane, jak sądzi doktorant, odmiennym kontekstem molekularnym stosowanych modeli komórkowych. Sądzę, że ten aspekt badań, jako jeden z najważniejszych powinien być poddawany dalszej weryfikacji.

Na podstawie wyników wymienionych badań przesiewowych i rozważań dotyczących relacji struktura-aktywność, doktorant wytypował kilka związków, które - jak wnioskował - powinny wykazywać efekt hamujący wzrost guzów nowotworowych *in vivo*. Wstępne badania prowadził na dostatecznie licznych grupach myszy laboratoryjnych obarczonych guzami wywodzącymi się z implantowanych ortotopowo komórek nowotworowych mysiego gruczołu sutkowego. Po osiągnięciu przez guz objętości około 70 mm³, doktorant podawał zwierzętom codziennie, przez 3 tygodnie, izotiocyjniany w dawce 300 μmoli na kg masy ciała. Grupę kontrolną stanowiły myszy obarczone nowotworem, którym podawano jako związek referencyjny cyklofosfamid.

Wynikiem badań było wykazanie, że cztery związki oznaczone numerami 11, N11 [będące parami: izotiocyjnian 3,4-dimetoksybenzylowy i odpowiadający mu kwas merkaptopurowy] oraz, 88 i N88 [będące parami: izotiocyjnian ω-(benzoiloksyłowy) i odpowiadający mu kwas merkaptopurowy] hamowały wzrost guzów niemal tak skutecznie jak cyklofosfamid, ograniczając także efektywność rozsiewu komórek nowotworowych i ich zagnieżdżanie się w płucach. Szczególnie cenną obserwacją było wykazanie, że podawane związki nie wywołują niepokojących, nieakceptowalnych reakcji ubocznych, zmian w morfologii krwi, czy podstawowych parametrach biochemicznych. Interesującą obserwacją, mogącą mieć konsekwencje praktyczne (o ile wynik zostanie pozytywnie zweryfikowany i wyjaśniona zostanie przyczyna tego efektu) było wykazanie, że cytotoksyczność kwasu merkaptopurowego odpowiadającego związkowi 11 jest wobec komórek LoVo/DX nawet wyższa niż wyjściowego izotiocyjnianu.

W celu zbadania czy izotiocyjniany będą równie skutecznie hamowały wzrost guzów wywodzących się z ludzkich komórek nowotworowych jelita grubego (linia LoVo) wykonano stosowane doświadczenia na myszach z niedoborem odporności. Do badań doktorant wybrał związki 1 i N1 [będące parami: izotiocyjnian benzyłowy i odpowiadający mu kwas merkapturowy]; 75 i N75 [będące parami: izotiocyjnian ω-(hydroksyalkilo) i odpowiadający mu kwas merkapturowy]; oraz 88 i N88 [będące parami: izotiocyjnian ω-(benzoiloksyłowy) i odpowiadający mu kwas merkapturowy]. Wyniki hamowania wzrostu guza wywodzącego się z ludzkich komórek nowotworowych należy ocenić raczej jako mało zachęcające, bowiem obserwowany efekt był znacznie słabszy niż w przypadku próby hamowania wzrostu guza mysiego. Nie badano związku 11, bowiem jego efekt cytotoksyczny *in vivo* był oceniany w kolejnym doświadczeniu, którego celem było zbadanie czy izotiocyjnian oznaczony tym numerem, uznany na podstawie badań pracy doktorskiej nie tylko za najsilniej hamujący proliferację komórek LoVo, ale także komórek LoVo/DX opornych na działanie doksorubicyny będzie w leczeniu skojarzonym działał synergistycznie z doksorubicyną.

Podając doksorubicynę w dawce 1mg/kg masy ciała, raz w tygodniu przez 4 tygodnie, oraz równocześnie izotiocyjnian 11 w dawce 300 μmol/kg masy ciała 5 razy w tygodniu doktorant wykazał, że taka strategia (jakkolwiek trudno zaproponować na razie lepszą) nie przynosi zadowalającego efektu terapeutycznego, a obserwowany efekt skojarzonego

działania doktorant ocenia jako „raczej addytywny”. Należy zauważyć, że w trakcie leczenia skojarzonego obserwowano u myszy poważne efekty uboczne.

Dysponując bardzo obszerną biblioteką znacznie zróżnicowanych strukturalnie izotiocyanianów i odpowiadających im kwasów merkapturowych oraz informacjami o cytotoksyczności tych związków (wartości IC50 w zakresie stężeń od około 2 -1000 μM), doktorant mógł dokonać wstępnej oceny zależności efektywności działania związku od jego struktury chemicznej oraz spróbować wyjaśnić mechanizm działania tych izotiocyanianów, które takiej oceny były warte.

Przystępując do wymienionych badań doktorant wybrał do analizy 17 reprezentatywnych, znacząco różniących się strukturalnie związków, ograniczając racjonalnie również model komórkowy do komórek LoVo i LoVo/DX. Ponieważ izotiocyaniany wnikając do komórki tworzą niemal natychmiast połączenia z glutationem doktorant przede wszystkim oznaczył stopień akumulacji badanych izotiocyanianów po krótkim (w stosunku do badań cytotoksyczności) czasie inkubacji komórek z wybranymi związkami. Najsilniej akumulującym się izotiocyanianem okazał się związek 11, natomiast do najslabiej akumulujących się należy zaliczyć: 12,16,18, 39, 60.

Bez względu na to czy efekt biologiczny izotiocyanianów wynika z ich oddziaływania z celami molekularnymi innymi niż glutation, czy też wywołany jest obniżeniem puli glutationu, w komórkach nowotworowych traktowanych aktywnymi biologicznie izotiocyanianami powinny zachodzić zmiany prowadzące do ograniczania ich funkcji życiowych z możliwością nieodwracalnego wejścia na drogę śmierci komórkowej, lub prowadzące do np. stanu starzenia replikacyjnego.

W tym kontekście doktorant badał wpływ wybranych izotiocyanianów na cykl komórkowy oraz na zmiany potencjału mitochondrialnego. Jak wykazał, większość badanych związków hamowała cykl komórkowy w fazie G2/M przy czym w przypadku komórek LoVo najsilniej działały związki 11 i 75, a w przypadku komórek LoVo/DX związki 7, 11, 72, 75. Doktorant zaobserwował równocześnie, że w przypadku związków 11 i 18 zwiększała się znacznie subpopulacja komórek w fazie subG1, co można z grubsza interpretować jako obecność komórek z zawartością DNA mniejszą niż w komórkach diploidalnych, najprawdopodobniej w wyniku wejścia komórek na drogę apoptozy.

Aby nieco szerzej spojrzeć na możliwość indukowania przez badane izotiocyaniany procesu apoptozy doktorant wykazał, że związki te wykazują właściwość naruszania potencjału mitochondrialnego (jakkolwiek nie wiadomo czy zmiany te doprowadzały do permeabilizacji błony mitochondrialnej i uwolnienia cytochromu c i innych białek proapoptotycznych np. SMAC/DIABLO, Htr/Omi czy AIF). O tym, że taki proces może jednak zachodzić świadczy wykazanie przez doktoranta, że w komórkach traktowanych badanymi izotiocyanianami aktywowana jest efektorowa kaspaza 3, przy czym znów najefektywniejszy w tym doświadczeniu okazał się związek 11. Z drugiej strony, jeżeli przyjmie się, że w analizie wykonanej metodą cytometrii przepływowej populacja komórek subG1 może w pewnym stopniu wskazywać na zachodzenie procesu apoptozy, to oprócz związku 11 także związek 18 powinien silnie indukować ten proces. Jednak izotiocyanian 18

nie został scharakteryzowany jako silnie zmieniający potencjał mitochondrialny i silnie aktywujący kaspazę 3.

Szczególnie ważnym aspektem badań doktoranta w odniesieniu do mechanizmu wywoływania biologicznych efektów przez izotiocyjaniany było wykonanie doświadczenia mogącego dostarczyć argumentu na poparcie hipotezy postulującej, że kwasy merkapturowe, nie mając zdolności do efektywnego wnikania do komórek mogą jednak - w wyniku przemian hydrolitycznych przebiegających w mikrośrodku komórek nowotworowych - stanowić odnawialne źródło aktywnych izotiocyjanianów. Jak wykazał doktorant, obecność w pożywce hodowlanej nadtlenu wodoru zwiększała efektywność procesu akumulacji izotiocyjanianów w komórkach LoVo.

Praca doktorska jest bardzo obszernym opracowaniem zachowującym (pomijając brak wyodrębnionego streszczenia i wniosków) układ standardowy z następującymi rozdziałami „Wstęp” (27 stron), „Cel pracy”, „Badania własne” (108 stron), „Dyskusja” (20 stron), „Część eksperymentalna” (40 stron), „Spis schematów, tabel oraz wykresów” (11 stron), „Literatura” (22 strony; 317 pozycji piśmiennictwa), oraz rozdział podsumowujący dorobek naukowy doktoranta (4 strony). Doktorant przygotowując tekst pracy postarał się o zachowanie dobrych standardów językowych, co sprawia, że liczba niezręczności stylistycznych, wyrażeń z żargonu laboratoryjnego, czy też tzw. „literówek” jest prawie niezauważalna. Wyniki badań przedstawione są drobiazgowo, ale klarownie. Rozdziały odnoszące się do prac doświadczalnych omówiłem powyżej, zatem należy odnieść się teraz do rozdziałów „Wstęp” i „Dyskusja”.

Rozdział „Wstęp” jest racjonalnie skonstruowany i w sposób skondensowany oraz przejrzysty przedstawia najważniejsze informacje o właściwościach izotiocyjanianów, mechanizmach ich powstawania z obecnych w diecie glukozylanów, mechanizm ich przekształcania w kwasy merkapturowe. Omawia także przyczyny zainteresowania nauk farmaceutycznych, medycznych i chemicznych poszukiwaniem możliwości zastosowania naturalnych związków z tej grupy lub ich modyfikowanych chemicznie lub biologicznie pochodnych jako leków przeciwnowotworowych.

Doktorant bardzo wyraźnie podkreśla plejotropowość działania wielu biologicznie aktywnych związków, w tym szczególnie izotiocyjanianów, a odnosząc tę właściwość do ich możliwego zastosowania jako leków przeciwnowotworowych doktorant wskazuje, że brak wyróżniającego się celu molekularnego może być w tym zastosowaniu czynnikiem sprzyjającym i tę okoliczność wnikliwie uzasadnia. Mimo wymienianych w piśmiennictwie dotyczącym przedmiotu badań doktoranta wielu uznanych i domniemych celów molekularnych izotiocyjanianów, kilka ścieżek odpowiedzialnych za aktywność biologiczną tych związków ma szczególnie istotne znaczenie. Ścieżki te, a chodzi o oddziaływanie izotiocyjanianów z glutationem, indukowanie stresu oksydacyjnego, wpływ na enzymy detoksyfikujące oraz modulowanie aktywności elementów wewnętrznej (mitochondrialnej) ścieżki apoptotycznej, a także modulowanie przebiegu cyklu komórkowego, są szerzej przez doktoranta omawiane, bowiem procesy te odnoszą się bezpośrednio do przedmiotu i celu badań.

W końcowej części rozdziału „Wstęp” doktorant omawia intrygujące i ważne zjawisko, a mianowicie, że mimo wysokiej reaktywności grupy izotiocyanianowej i możliwości modyfikowania przez izotiocyaniany rozmaitych makrocząsteczek biologicznych systemowa toksyczność zbadanych dotychczas związków jest stosunkowo niewielka. Rozdział „Wstęp” kończy się podaniem przyczyn, które sprawiają, że izotiocyaniany mimo wieloletnich badań nie zostały dotychczas zaaprobowane jako standardowe, stosowane rutynowo leki przeciwnowotworowe.

Rozdział „Dyskusja”, wobec braku wyodrębnionego streszczenia i wniosków końcowych zawiera treści, które w tych rozdziałach bez wątpienia zostałyby zamieszczone. Doktorant rozpoczyna dyskusję od przypomnienia, że mimo wieloletnich wysiłków licznych grup badawczych, ciągle izotiocyaniany nie są stosowane w praktyce klinicznej, co jak sądzi może wynikać stąd, że dotychczas jedynie kilka związków z niezwykle licznej grupy izotiocyanianów było przedmiotem systematycznych badań. Przypomina także, że jednym z przedsięwzięć mogących zwiększyć szansę natrafienia na nowego, obiecującego kandydata na lek przeciwnowotworowy, jest równoczesne przebadanie właściwości cytotoksycznych (wobec komórek nowotworowych, ale także prawidłowych) możliwie najliczniejszej grupy naturalnych izotiocyanianów. Zrealizowanie tej strategii stało się celem pracy, a jego realizacja doprowadziła do wykazania, że wśród zbadanych kilkudziesięciu izotiocyanianów i ich metabolitów, kwasów merkapturowych znajdują się związki o oczekiwanych przez doktoranta właściwościach cytotoksycznych, podobnych do aktywności niektórych leków stosowanych rutynowo.

Przechodząc do dyskusji problemu zależności aktywności cytotoksycznej od struktury doktorant podkreśla, że optymalna aktywność badanych izotiocyanianów warunkowana jest obecnością oprócz grupy -NCS także innego podstawnika, przy czym, jak podkreśla doktorant, związek pomiędzy aktywnością związku a strukturą tej drugiej grupy pozostaje niejasny. Analizując wyniki własnych badań i porównując je z danymi z piśmiennictwa doktorant kwestionuje uniwersalność przekonania, że w grupie izotiocyanianów alifatycznych aktywność grupy izotiocyanianowej maleje wraz ze wzrostem łańcucha alifatycznego. Jednym z ciekawych wyników doktoranta jest obserwacja, że aktywność cytotoksyczna badanych związków w pewnym zakresie parametru wyznaczającego lipofilowość (cLogP) spadała, a następnie mimo wzrostu tego parametru aktywność związków wzrastała.

Kolejnym elementem podnoszonym w dyskusji jest zależność aktywności izotiocyanianów od reaktywności względem glutationu. Doktorant potwierdził i umocnił przekonanie, że akumulacja izotiocyanianów w komórce w wyniku reakcji z glutationem nie ma decydującego znaczenia dla wyrażania się cytotoksyczności izotiocyanianów i nie koreluje z ich antyproliferacyjną aktywnością. Doktorant wskazuje tutaj inne czynniki, jak np. szybkość konwersji koniugatów izotiocyanianów z glutationem w szlaku kwasów merkapturowych.

Druga część dyskusji poświęcona jest rozważaniom o mechanizmach cytotoksycznej aktywności badanych związków. Doktorant w zasadzie jedynie przytacza istniejące w piśmiennictwie przekonanie, poparte wieloma obserwacjami, że główny mechanizm to

blokowanie cyklu komórkowego, głównie w fazie G2/M. Wyniki badań zawartych w pracy doktorskiej, a mianowicie wykazanie, że najsilniej działające związki blokowały cykl komórkowy w fazie G2/M ugruntowują powyższe przeświadczenie. Bardziej szczegółowy mechanizm cytotoksycznego działania badanych związków nie jest jednak przez doktoranta proponowany (mimo szerokich odniesień do piśmiennictwa, dotyczącego co prawda jednak tylko kilku wybranych związków). Na podstawie obserwacji własnych doktorant wyciąga jednak ważny wniosek, że zależność pomiędzy zdolnością izotiocyjanianów do hamowania cyklu komórkowego, a zdolnością do indukowania stresu oksydacyjnego, nie jest właściwością uniwersalną.

Kończąc rozważania o mechanizmie działania izotiocyjanianów doktorant, podsumowując wszystkie wątki dyskusji dotyczące tego problemu stwierdza, że wyniki jego badań (w połączeniu z danymi literaturowymi) bardzo wyraźnie i jednoznacznie ukazują związek struktury izotiocyjanianów z ich aktywnością biologiczną, w tym z właściwością hamowania proliferacji komórek nowotworowych *in vitro*. Uzupełnieniem tego stwierdzenia jest ilustracja ukazująca najistotniejsze elementy strukturalne decydujące o dyskutowanych właściwościach.

Niezwykle istotny i ciekawy fragment dyskusji odnosi się do obserwacji doktoranta, ukazującej, że hydroliza kwasów merkapturowych będzie efektywniej w warunkach stresu oksydacyjnego. Oryginalną koncepcją doktoranta jest tu możliwość wykorzystania podwyższonego poziomu wolnych rodników tlenowych w środowisku guza nowotworowego, jako elementu przyspieszającego rozpad kwasów merkapturowych do aktywnych biologicznie izotiocyjanianów. Doktorant jednocześnie dyskutuje szereg warunków, jakie powinny zaistnieć, aby jego koncepcja mogła znaleźć praktyczne zastosowanie. Gdyby istotnie ta koncepcja została pozytywnie zweryfikowana doświadczalnie, wtedy pojawiła by się możliwość stosowania kwasów merkapturowych jako proleków.

Kończącą część dyskusji kończą rozważania odnoszące się do efektu przeciwnowotworowego obserwowanego w badaniach *in vivo*. Ponieważ badania prowadzone przez doktoranta w tym zakresie mają znaczny element nowości naukowej, dlatego podkreśla, że po raz pierwszy została wykonana analiza porównawcza efektu przeciwnowotworowego izotiocyjanianów i ich pochodnych merkapturowych. Podkreśla również, że po raz pierwszy wykonano badania *in vivo* na komórkach wywodzących się z nowotworów ludzkich implantowanych myszom z niedoborem układu immunologicznego.

Uwagi szczegółowe

Strona tytułowa. Słowo „formulacja” w tytule pracy nie jest chyba użyte właściwie, ponieważ praca nie dotyczy postaci leku.

Spis stosowanych skrótów – w przypadku kilkunastu skrótów doktorant podaje jedynie rozwinięcie w języku angielskim

Wstęp. Str.14. Na dole strony. Stwierdzenie, że rozwój choroby nowotworowej opiera się na postępujących mutacjach kodu genetycznego nie jest całkiem prawdziwy. Mutacje w regionach DNA niezawierających sekwencji kodującej białka też są istotne.

Wstęp. Str. 25. Na schemacie 6, na samym dole ryciny zamiast S-acetylo-(podstawnik)-cysteina, powinno być raczej N-acetylo-S-(podstawnik)-cysteina.

Wstęp. Str. 33. Cytowanie [134]. Powinno być chyba [136].

Podrozdział 3.2.1. Testy cytotoksyczności i wyznaczenie IC50 wykonywano inkubując komórki 72 godziny w stałej obecności badanych związków. Badanie akumulacji prowadzono inkubując komórki w obecności związków maksymalnie 2 godziny. Akumulacja niektórych związków była po 2 godzinach inkubacji niższa niż po 30 minutach. Tak było np. w przypadku silnie toksycznego związku 7 i podobnie w przypadku np. stosunkowo toksycznego związku 39 (IC50 = 15.1), czy związków 72 i 75. Czy można przyjąć, że bodziec indukujący procesy prowadzące ostatecznie do ograniczenia proliferacji pojawia się tuż po ekspozycji komórek na wymienione izotiocyjaniany, czy też raczej należy przyjąć, że zmiany w metabolizmie komórek powodujące ograniczenia proliferacji pojawiają się w wyniku długotrwałej inkubacji komórek przy ostatecznie niskiej akumulacji ?

W przypadku każdego związku stosowano to samo stężenie (25 μ M) zarówno dla związków silnie toksycznych, o niskim IC50 (np. związek 11 z IC50 = 2.6), jak i dla związków niezbyt toksycznych o wysokim IC50 (np. związek 15 z IC50 = 296). Czy stosowanie np. w przypadku związku 11 stężenia 10-krotnie wyższego od IC50 nie zaburza procesu akumulacji? (może np. zachodzić modulowanie procesów odpowiedzialnych za akumulację). Tym bardziej, że na stronie 85 doktorant pisze, że traktowanie komórek najaktywniejszymi związkami w stężeniu 25 μ M może prowadzić do procesów nekrotycznych.

Str. 89. Wykres 9. W tekście pod ryciną doktorant pisze, że poziom glutationu silnie obniża także związek 72, co jednak jest sprzeczne z danymi pokazanymi na wykresie 9. Prawdopodobnie chodzi o związek 75.

Str. 108 i wykres 18 na stronie 110. Doktorant pisze, że niektóre związki powodują obniżanie liczby przerzutów do płuc, co jest wyraźnie skorelowane z obniżaniem masy płuc. Jak oceniano liczbę przerzutów, w stosunku do jakiego parametru?

Podrozdział 3.4.3. Jeśli efekt przeciwnowotworowy badanych związków był słabszy w przypadku myszy z niedoborem układu immunologicznego, to czy nie należy sądzić, że w przypadku myszy obarczonych guzem mysim silniejszy efekt przeciwnowotworowy wynika z pobudzenia przez badane związki układu immunologicznego (np. aktywacja cytotoksycznych limfocytów T, czy limfocytów NK)?

Str. 137 i Tabela 16 na str. 138. Doktorant podaje na str. 137, że badania morfologii krwi zwierząt (Tabela 16) wykazały, że komórki sublinii LoVo/DX wykazują dużo wyższą immunogenność, aniżeli wyjściowa linia LoVo. Z opisu tabeli 16 wynika, że zawarte w niej dane odnoszą się do myszy obarczonych nowotworem wywodzącym się z komórek LoVo/DX. Nie ma w tabeli danych dotyczących linii LoVo. Ponadto stwierdzenie na początku strony 137, że komórki sublinii LoVo/DS są bardziej immunogenne niż linia LoVo ponieważ obserwuje się wzrost frakcji leukocytów, jest niezbyt precyzyjne. Wzrost liczby leukocytów może wynikać z innych przyczyn.

Str.152. Odnośnie dawek i efektu izotiocyjanianu benzyłowego. Doktorant podawał wymieniony izotiocyjanian w dawce 4.5 krotnie wyższej niż badacze w cytowanej pracy (pozycja piśm. 273), uzyskując silniejszy efekt terapeutyczny. Doktorant jednocześnie pisze, że: "wyższa dawka miała wyraźnie istotniejszy wpływ na masę przede wszystkim śledzion i płuc, co sugeruje jej silniejszy efekt przeciwprzerzutowy". Jaki jest związek zmian masy narządu z przerzutowaniem?

Uwagi ogólne.

- W tekście pracy pojawia się często zwrot „czysty związek”. Czy nie byłoby bardziej właściwe podać jakieś dane liczbowe, bądź napisać, że poziom i rodzaj zanieczyszczeń (jeśli były) nie mogły mieć wpływu na otrzymane wyniki?
- Skąd pochodziły izotiocyjaniany niesyntetyzowane przez doktoranta?
- W trakcie badań cytotoksyczności rozmaitych związków czasem obserwuje się, że niektóre z nich w niższych dawkach przyspieszają proliferację komórek, natomiast hamują wzrost komórek dopiero w dawkach wyższych. Czy przy wyznaczaniu wartości IC50 przez doktoranta taki efekt był obserwowany? Problem jest ważny, ponieważ istnienie takiego efektu byłoby argumentem wykorzystywanym przez przeciwników stosowania izotiocyjanianów jako leków antyproliferacyjnych.
- Skoro wyniki badań wskazują, że do ujawnienia się w pełni aktywności antyproliferacyjnej konieczny jest drugi podstawnik (ale jednocześnie jego natura chemiczna odgrywa drugorzędną rolę), to jakie może być funkcjonalne znaczenie drugiej grupy?
- Akumulacja izotiocyjanianów, zwłaszcza w ujęciu badanym przez doktoranta, jest pojęciem niezbyt precyzyjnym i w zasadzie niewiele mówi o mechanizmie działania tych związków. Jeśli nie można określić proporcji pomiędzy różnymi formami w jakich znajduje się izotiocyjanian w czasie rozmaitych reakcji chemicznych i biochemicznych zachodzących w komórce i równocześnie nie można określić, która z tych form ma lub nie ma aktywności biologicznej, to w istocie trudno jest nawet spekulować o mechanizmie działania. Jeśli metabolity izotiocyjanianów mają, jak można wnioskować z badań doktoranta oraz z danych z piśmiennictwa aktywność biologiczną podobną do wyjściowych izotiocyjanianów, oraz jak pisze doktorant (strona 146), że zmiany struktury chemicznej izotiocyjanianów umożliwiają modulowanie kinetyki procesu akumulacji pozostając bez istotnego wpływu na aktywność antyproliferacyjną to: czy można ostatecznie sądzić, że w istocie jedynie nieznaczna frakcja izotiocyjanianu ma rzeczywistą aktywność antyproliferacyjną, natomiast większość związku zakumulowana w komórce to rozmaite nieaktywne struktury (pozbawione reaktywnej reszty izotiocyjanianowej)?
- Silna aktywność antyproliferacyjna izotiocyjanianów w stosunku do komórek o fenotypie oporności wielolekowej jest intrygująca. Czy jest brana pod uwagę możliwość, że zanim izotiocyjaniany znajdą się w cytoplazmie i zanim zostaną skoniugowane z glutationem mogą inaktywować układy enzymatyczne usuwające cytostatyki z komórki?
- Jeśli mamy do czynienia z wysokim poziomem akumulacji izotiocyjanianów na skutek połączeń z glutationem, to obniżenie poziomu glutationu powinno zwiększać wrażliwość komórek na cytotoksyczne działanie wolnych rodników tlenowych. Czy można zatem sądzić, że izotiocyjaniany silnie obniżające poziom glutationu powinny nasilać cytotoksyczność leków przeciwnowotworowych generujących stres oksydacyjny, a także wzmacniać cytotoksyczne działanie promieniowania jonizującego?

- W badaniach *in vivo* związku podawano bądź doustnie bądź dootrzewnowo. Czym kierowano się wybierając metodą podawania?
- Jakkolwiek stosowanie stylu bezosobowego jest przyjęte, to w niektórych fragmentach tekstu rozprawy doktorant powinien stosować styl osobowy. Trudno np. od razu zrozumieć do czyich badań odnoszą się fragmenty dyskusji na stronach 152 i 153, gdzie doktorant pisze o badaniu izotiocyjanianów i ich pochodnych merkapturowych *in vivo*.

Ponieważ rozprawa doktorska nie zawiera wyodrębnionych wniosków końcowych warto aby doktorant ustosunkował się do kilku pytań. Po pierwsze: czy na podstawie wykonanej analizy porównawczej można zaproponować jaką strukturę powinien mieć izotiocyjanian o pożądanej aktywności przeciwnowotworowej i pozbawiony właściwości wywoływania efektów ubocznych. Po drugie: w jakim kierunku powinny być dalsze badania, np. czy raczej w stronę modyfikowania struktury znanych izotiocyjanianów, syntezy całkowicie nowych struktur, czy też w kierunku optymalizowania strategii celowanego podawania już scharakteryzowanych, najbardziej bioaktywnych izotiocyjanianów. Po trzecie, czy na podstawie wyników dotychczasowych badań rysuje się konieczność analizowania korelacji genotypu komórek z działaniem określonego izotiocyjanianu.

Podsumowanie oceny

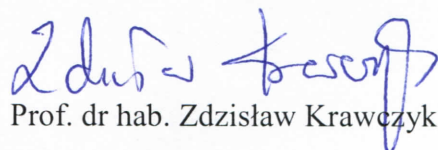
Praca doktorska mgr. inż. Mateusza Psurskiego jest pierwszym opracowaniem, którego celem było wykonanie badań przesiewowych w kierunku wykrycia nowych izotiocyjanianów, mogących efektywnie hamować proliferację komórek nowotworowych, w tym komórkach cechujących się opornością na leki. Na podkreślenie zasługuje to, że spośród niemal 90 związków będących przedmiotem badań, znaczna ich większość została zsyntetyzowana przez doktoranta. Ponieważ liczna grupa izotiocyjanianów wyselekcjonowanych na podstawie badań cytotoksyczności/hamowania proliferacji oraz na podstawie zróżnicowanej struktury podstawników została poddana wielokierunkowym badaniom, doktorant sporządził nadzwyczaj wartościową bazę danych, która będzie bez wątpienia wykorzystywana w dalszych badaniach relacji struktury izotiocyjanianów i ich właściwości biologicznych. Bez wątpienia cenną wartością badań tak licznej grupy pochodnych jest możliwość weryfikacji istniejących w piśmiennictwie przeświadczeń o przyczynach aktywności lub nieaktywności biologicznej izotiocyjanianów.

Cel pracy doktorskiej został w pełni osiągnięty, a większość obserwacji poczynionych przez doktoranta to obserwacje oryginalne o istotnej wartości poznawczej. Bardzo ważnym elementem badań doktoranta jest – uzyskane w wyniku konfrontacji wyników badań własnych z wynikami prac już opublikowanych przez inne grupy - potwierdzenie lub skorygowanie istniejących przekonań o niektórych właściwościach biologicznych izotiocyjanianów. Należy tu zwrócić szczególną uwagę na umocnienie przeświadczenia, że to, jaki efekt fenotypowy zostanie wywołany przez określony izotiocyjanian, zależy w znacznym stopniu od rodzaju komórek, co jednocześnie wskazuje, że genotyp komórek odgrywa tu istotną rolę. Wniosek ten oczywiście inspirowa do dalszych badań, zmierzających

do wyjaśnienia, czy w określeniu celowości stosowania danego izotiocyjanianu jako potencjalnego leku pomocna będzie wstępna analiza farmakogenomiczna. Atrakcyjną sugestią wynikającą z badań doktoranta, inspirującą do dalszych badań jest możliwość stosowania w pewnych okolicznościach, wskazanych przez doktoranta, kwasów merkapturowych, zamiast izotiocyjanianów.

Moim zdaniem, przekazana do oceny rozprawa spełnia (pomijając brak streszczenia w języku angielskim) warunki stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 ustawy o stopniach i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 (z późniejszymi zmianami), zatem wnioskuję do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie doktoranta, mgr. inż. Mateusza Psurskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną rozprawy oraz opublikowanie części badań w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, składam wniosek o jej wyróżnienie.

Gliwice, 25 czerwca 2015


Prof. dr hab. Zdzisław Krawczyk