

Ocena pracy doktorskiej

pt. „**Komórkowe mechanizmy aktywności biologicznej sulfonamidów, pochodnych układu pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazyny w prawidłowych i nowotworowych komórkach człowieka in vitro**”

przygotowanej przez p. mgra Mateusza Pawła Kciuka

pod kierunkiem p. dr hab. Renaty Kontek, prof. UŁ i p. prof. dr hab. Mariusza Mojzycha

Powstanie nowotworu i jego rozwój jest procesem złożonym, dynamicznym, zależnym od mikrośrodowiska. Nowotwory są heterogenne i plastyczne co oznacza, że cechuje je zdolność do adaptacji do zmieniających się warunków. Dotyczy to zarówno zmian warunków naturalnych np. przy powstawaniu przerzutów, jak i generowanych w trakcie interwencji terapeutycznych. Znalezienie skutecznego leku trwale eliminującego komórki nowotworowe, bez poważnych skutków ubocznych dla pacjenta onkologicznego pozostaje wyzwaniem dla badaczy i lekarzy, pomimo znaczących osiągnięć medycyny w ostatniej dekadzie. W nurt poszukiwań leków przeciwnowotworowych wpisują się badania naukowe przeprowadzone przez p. mgra Mateusza Kciuka pod kierunkiem p. dr hab. Renaty Kontek i p. prof. dr hab. Mariusza Mojzycha.

W pracy doktorskiej przygotowanej w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Genetyki Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego we współpracy z Instytutem Nauk Chemicznych Wydziału Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach (obecnie Uniwersytetu w Siedlcach), p. mgr Mateusz Kciuk podjął próbę zbadania

mechanizmów działania sulfonamidowych pochodnych pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazyny w komórkach nowotworowych i prawidłowych.

Przedłożona mi do recenzji praca ma typowy układ dysertacji doktorskiej przygotowanej w oparciu o publikacje. W skład rozprawy doktorskiej wchodzi trzy spójne tematycznie prace oryginalne oraz jedna praca przeglądowa, opublikowane w latach 2020-2023 w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. We wszystkich publikacjach oryginalnych p. mgr Mateusz Kciuk jest pierwszym autorem, a oświadczenia współautorów wskazują na wiodący wkład Doktoranta w ich powstanie. Wspomniane prace poprzedzone są wykazem skrótów, wprowadzeniem do tematyki badań oraz rozdziałami opisującymi hipotezę badawczą, cele pracy, główny i szczegółowe, a także zastosowane materiały i metody. W kolejnym rozdziale omówione zostały publikacje wchodzące w skład pracy doktorskiej. Rozprawę zamykają dyskusja uzyskanych wyników na tle literatury światowej, wnioski, wykaz cytowanych pozycji literaturowych oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Układ dysertacji doktorskiej jest poprawny.

Analiza tematu rozprawy, celów badawczych, metod, wyników i ich dyskusji oraz poprawności językowej rozprawy

Ocena części teoretycznej

Część teoretyczna jest syntetyczna, typowa dla rozpraw doktorskich przygotowanych w oparciu o publikacje oryginalne. W swoich rozważaniach Doktorant krótko przedstawił epidemiologię nowotworów, sposoby leczenia pacjentów onkologicznych oraz strategię opracowywania leków przeciwnowotworowych. Są tu także informacje na temat aktywności biologicznej sulfonamidowych pochodnych pirazolo-triazyny, głównie w aspekcie potencjalnego zastosowania ich w leczeniu pacjentów z nowotworami. Część teoretyczna rozprawy stanowi dobre wprowadzenie do zagadnień będących przedmiotem badań opisanych w publikacjach wchodzących w skład rozprawy. Z tej części pracy wynika, że wybór kierunku badań był uzasadniony.

Ocena metodyki badań

W pracy laboratoryjnej zastosowano kilka podstawowych metod często używanych do wstępnej oceny aktywności nowych związków w komórkach nowotworowych. Opis materiałów i metod w dołączonych publikacjach jest wystarczająco szczegółowy. Wykorzystano szereg metod do oceny cytotoksyczności badanych związków i ich wpływu na proliferację komórek poprzez zbadanie integralności błony komórkowej lub aktywności metabolicznej komórek, w tym barwienie błękitem trypanu, resazuryną, czerwienią obojętną, oranżem akrydyny i bromkiem etydyny, test MTT oraz test włączenia bromodeoksyurydyny. Zastosowano cytometrię przepływową, mikroskopię, czytnik luminescencji i fluorescencji oraz techniki elektroforetyczne w celu zbadania właściwości proapoptotycznych badanych związków. Wpływ na ekspresję wybranych genów badano techniką PCR w czasie rzeczywistym. Oprócz badań *in vitro* wykonano analizę *in silico*, w tym dokowanie molekularne i symulację dynamiki molekularnej, w której to analizie, wykonanej we współpracy z ośrodkami zagranicznymi, Doktorant zadeklarował swoje uczestnictwo.

Ocena wartości merytorycznej uzyskanych wyników

Wyniki badań przedstawiono w formie omówienia publikacji oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. W swojej ocenie odnoszę się do tych wyników badań przedstawionych w publikacjach, w powstaniu których Doktorant brał aktywny udział. We wszystkich pracach doświadczalnych oceniano aktywność pochodnych sulfonamidowych pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazyny, oznaczonych jako MM1134, MM136, MM137 i MM139, w liniach komórkowych gruczolakoraka trzustki (BxPC-3) i gruczołu krokowego (PC-3), a także w niewielkim zakresie w liniach komórkowych raka jelita grubego (HCT-116) oraz fibroblastów prawidłowych mysich (L929) i ludzkich (WI-38). W pracy opublikowanej w 2022 roku w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (publikacja nr 2 cyklu) przedstawiono strukturę chemiczną badanych związków. Zastanawia mnie jaką strukturę mają związki MM134 i MM136. W którym z tych związków występuje podstawnik morfolinowy, a w którym N-aminoetylomorfolinowy? Czy w pracy doświadczalnej definiowano je tak jak przedstawiono je na

Rycinie 1, czy jak na Rycinie 2 w wymienionej publikacji? Zakładam, że poprawne struktury znajdują się na Rycinie 1, gdyż tak właśnie przedstawiono te pochodne w innej pracy oryginalnej, której Doktorant jest współautorem. Publikacja nr 2 cyklu miała kluczowe znaczenie dla większości wyników opublikowanych w pracach doświadczalnych. Stosując test MTT po 72-godzinnej inkubacji komórek z sulfonamidowymi pochodnymi pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazyny wyznaczono wartości IC_{50} dla każdej pochodnej, w każdej z badanych linii komórkowych. Wartości te nie zostały jednak wykorzystane do wyznaczenia zakresu stężeń, lecz były stosowane w pozostałych badaniach, co oznacza, że każda pochodna była badana w innym stężeniu, które odpowiadało wartości IC_{50} lub wielokrotności tej wartości. W mojej ocenie, nie jest to optymalna metoda doboru stężeń z dwóch powodów: po pierwsze, na wyniki uzyskane testem MTT po 72-godzinnej inkubacji mogło mieć wpływ szereg czynników poza zastosowanymi pochodnymi; po drugie, porównywanie aktywności badanych pochodnych było znacząco utrudnione i mogło prowadzić do niewłaściwych wniosków, których przykłady przedstawiam poniżej.

Kolejne pytanie, które się nasuwa to czy można mówić o aktywności przeciwnowotworowej, jeżeli wartości IC_{50} w komórkach nowotworowych i prawidłowych dla badanych pochodnych, w szczególności dla najbardziej aktywnego związku MM137 są zbliżone. Sulfonamidowe pochodne pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazyny najefektywniej obniżały przeżywalność (mierzoną testem MTT) komórek linii PC-3, natomiast w przypadku komórek linii BxPC-3 odnotowano obniżenie przeżywalności na porównywalnym poziomie jak w przypadku komórek prawidłowych linii L929 dla większości pochodnych, np. IC_{50} dla MM137 w komórkach nowotworowych linii BxPC-3 wynosiło 0,16 μ M, natomiast w fibroblastach linii L929 wynosiło 0,18 μ M, IC_{50} dla MM139 dla komórek nowotworowych linii BxPC-3 i prawidłowych linii L929 wyniosło odpowiednio 0,33 μ M i 0,26 μ M. Istotne jest również pytanie jak wytłumaczyć znaczące różnice w wynikach otrzymanych metodą MTT w porównaniu z wynikami dotyczącymi indukcji apoptozy, które zostały uzyskane metodą cytometryczną z zastosowaniem znakowanej aneksyny V i mikroskopową z zastosowaniem barwienia oranżem akrydyny i bromkiem etydy. Podczas gdy pochodne triazyny w większym stopniu zmniejszały % żywych komórek linii PC-3 niż linii BxPC-3, w indukcji apoptozy pochodne triazyny były dużo bardziej efektywne w komórkach linii BxPC-3 w porównaniu z linią komórkową

PC-3. W komórkach PC-3 procent komórek apoptotycznych wzrastał w niewielkim stopniu nawet po inkubacji z pochodnymi triazyny w stężeniu odpowiadającym $2 \times IC_{50}$ przez 48 godzin. Przy okazji zwracam uwagę, że w dysertacji użyto niewłaściwych wartości w odniesieniu do przyrostu komórek apoptotycznych względem kontroli. Na podstawie oryginalnych wyników z jednego doświadczenia zamieszczonych w suplemencie publikacji można wnioskować, że przyrosty np. dla MM137 w komórkach linii PC-3 po 48-godzinnej inkubacji wynosiły 14,3% (dla IC_{50}) 30,6% (dla $2 \times IC_{50}$) zamiast 22,6% i 38,9%, jak napisano w dysertacji. Wyniki analizy cytometrycznej frakcji apoptotycznej są również dobrą ilustracją problemu, jaki pojawił się przy stosowaniu pochodnych w różnych stężeniach. Biorąc pod uwagę zastosowane stężenia wyciągnęłabym wnioski, że związki MM134, -37 i -39 miały podobną aktywność proapoptotyczną w komórkach BxPC-3 ze wskazaniem na MM137, oraz że związki MM134 i MM139 były bardziej efektywne w indukcji apoptozy w komórkach BxPC-3 niż w komórkach PC-3. Sulfonamidowe pochodne triazyny indukowały zmiany w potencjale błony mitochondrialnej na porównywalnym poziomie w przypadku obu zastosowanych linii komórek nowotworowych.

W kolejnych dwóch pracach opublikowanych w 2023 roku w *International Journal of Molecular Sciences*, przedstawione są dalsze badania przeprowadzone z tą samą grupą sulfonamidowych pochodnych pirazolo-triazyny. W pierwszej z nich (publikacja nr 3 cyklu) zastosowano kolejne dwa testy do oceny zmian w przeżywalności/prolifracji komórek pod wpływem badanych związków, test z użyciem błękitu trypanowego i test z użyciem błękitu Alamar (resazuryny). Uzyskane wyniki sugerują niewielki wpływ badanych związków zastosowanych w stężeniach równych IC_{50} na liczbę żywych komórek mierzoną po 24h. W teście z wykorzystaniem błękitu trypanowego, podobny efekt uzyskano dla komórek nowotworowych i prawidłowych. Niewłaściwe jest stwierdzenie, że związek MM134 indukował gwałtowny spadek przeżywalności, gdyż nie zamieszczono w publikacji krzywej czasowej lecz krzywą stężeniową. Analizę uszkodzeń DNA pod wpływem badanych pochodnych triazyny przeprowadzono na podstawie wyników testu kometowego w dwóch wariantach, alkalicznym i neutralnym oraz poziomu fosforylacji histonu H2AX (γ H2AX). Z analizy uszkodzeń DNA testem kometowym w wariacie alkalicznym wynika, że w komórkach linii BxPC-3 najefektywniejszy był związek MM137, dla którego przy stężeniu $0,32 \mu\text{M}$

mediana parametru „% DNA w ogonie komety” wynosiła 11,6% podczas, gdy w przypadku związku MM134 w tym stężeniu wynosiła 2,5%, natomiast dla MM139 w stężeniu 0,33 μ M wynosiła 4,74%. Wniosek ten różni się od przedstawionego w rozprawie. W komórkach PC-3 zastosowano niższe stężenia pochodnych uzyskując dużo niższą genotoksyczność z wyjątkiem pochodnej MM139, dla której mediana wyniosła 11,7% przy stężeniu 0,34 μ M. Wprawdzie w komórkach prawidłowych linii WI-38 uszkodzenia DNA generowane przez badane związki były na niskim poziomie, uzyskano statystycznie znamienne efekty dla każdej pochodnej w stężeniu 2 x IC₅₀, a dla pochodnej MM136 nawet w stężeniu 0,5 x IC₅₀. Aktywność pochodnych triazyny w komórkach prawidłowych może po części wynikać z zastosowania dużo wyższych stężeń badanych związków. Do analizy skupisk γ H2AX użyto komórek linii PC-3. Wprawdzie uzyskano statystycznie znamienne wzrost poziomu γ H2AX, nie można jednak wyróżnić związku o najwyższej aktywności biorąc pod uwagę różne stężenia pochodnych. Uwzględniając wszystkie wyniki oceniające indukcję uszkodzeń DNA różnymi metodami nie mogę zgodzić się z wnioskiem sformułowanym w dysertacji, że związek MM134 wykazywał najwyższą aktywność.

W kolejnej pracy opublikowanej w 2023 roku *International Journal of Molecular Sciences* (publikacja nr 4 cyklu), ponownie zastosowano metodę oceniającą wpływ pochodnych triazyny na poziom żywych komórek, tym razem test wychwyty czerwieni obojętnej po 24-godzinnej inkubacji z pochodnymi triazyny. Wyniki tego testu uznano za zbieżne z wynikami testu MTT po 72-godzinnej inkubacji, co wydaje się wynikiem zaskakującym tym bardziej, że w oznaczeniu przeżywalności przy zastosowaniu resazuryiny po 24-godzinnej inkubacji z pochodnymi triazyny nie osiągnięto redukcji poniżej 50% nawet w stężeniu 3 μ M. Wykazano wzrost poziomu reaktywnych form tlenu pod wpływem pochodnych triazyny w komórkach linii BxPC-3 i PC-3. Oznaczono również wzrost aktywności kaspaz. W komórkach linii BxPC-3 uzyskano podobny wzrost aktywności kaspaz 3/7 dla badanych pochodnych zastosowanych w tym samym stężeniu, natomiast w komórkach PC-3 nie wykryto przyrostu aktywności kaspaz 3/7. Wykonano również analizę zmian w ekspresji wybranych genów związanych z procesem apoptozy pod wpływem MM134, aczkolwiek nie jest napisane w dysertacji dlaczego pochodną z podstawnikiem N-amino-etylo-morfolinowym wybrano do tej analizy.

Podsumowując, niektóre wnioski zamieszczone w rozprawie nie znajdują potwierdzenia w uzyskanych wynikach. Wyniki badań *in vitro* otrzymane w ramach pracy doktorskiej mogą natomiast stanowić podstawę do dalszych badań szczególnie, że badane sulfamidowe pochodne pirazolo-triazyny wykazywały aktywność w komórkach nowotworowych już w stężeniach nanomolowych. W artykule przeglądowym opublikowanym w czasopiśmie *Molecules* (publikacja nr 1 cyklu) omówiono metody syntezy pochodnych triazyny oraz ich aktywność w komórkach nowotworowych. Proszę o ustosunkowanie się do dużo wyższych wartości IC_{50} dla aktywności przeciwnowotworowych pochodnych sulfonamidowych pirazolo-triazyny mierzonych testem MTT i przedstawionych w tej publikacji w porównaniu z wartościami IC_{50} w publikacji nr 2 cyklu. Poza innymi liniami komórkowymi, które zostały zastosowane w publikacjach 1. i 2. cyklu, jakie zmiany strukturalne w pochodnych triazyny mogły być odpowiedzialne za tak znaczące różnice w aktywności pochodnych.

Praca zawiera również analizę *in silico*, której wyniki sugerują, że badane sulfonamidowe pochodne pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazyny mogą potencjalnie hamować aktywność wielu biologicznie aktywnych cząsteczek, w tym kinazy tyrozynowej Brutona (BTK), białek ścieżki sygnałowej AKT-mTOR, a także oddziaływanie receptora PD1 z ligandem.

W krótkiej Dyskusji, p. mgr Mateusz Kciuk omawia wyniki badań własnych na tle wyników opublikowanych przez Zespół, w którym przygotował rozprawę. Są to głównie rozważania hipotetyczne. Do nich należy również schemat przedstawiający potencjalny mechanizm działania sulfonamidowych pochodnych pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazyny. Uważam, że przeprowadzone badania *in vitro* i analiza *in silico* są niewystarczające, aby zaproponować potencjalny model działania badanych związków. Z drugiej strony uważam, że kontynuacja badań sulfonamidowych pochodnych pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazyny może przynieść interesujące wyniki, również o potencjale translacyjnym.

Do pracy dołączono bogatą literaturę obejmującą 182 publikacje. Są to pozycje literaturowe właściwie wybrane. Znajdujemy tu pozycje opublikowane w prestiżowych czasopismach. W dysertacji wykorzystano także wiele publikacji Zespołów, z którymi Doktorant współpracował.

Ocena strony redakcyjnej pracy doktorskiej

Konstrukcja rozprawy doktorskiej p. mgra Mateusza Kciuka jest poprawna. W dysertacji znaleziono niewielką liczbę nieprawidłowo użytych lub niezręcznych określeń. Są to m.in.: „Liczba zachorowań na chorobę”; „z miejscem aktywnym ATP enzymu”; „od wewnętrznej zdolności komórek do umierania wobec określonego schematu”.

Poza tymi drobnymi niedociągnięciami stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została przygotowana poprawnie, zgodnie z normami przyjętymi dla prac doświadczalnych.

Ocena osiągnięć mgra Mateusza Kciuka

Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wskazują, że Doktorant wniósł indywidualny wkład w opracowanie koncepcji badań, wykonanie większości doświadczeń oraz opracowanie i interpretację otrzymanych wyników. Wszystkie czasopisma, w których zostały opublikowane wyniki badań mają zasięg międzynarodowy. Ich sumaryczny współczynnik wpływu (IF) wynosi ok. 21, natomiast łączna punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) wynosi 560. We wszystkich publikacjach oryginalnych p. mgr Mateusz Kciuk jest pierwszym autorem, a Jego procentowy udział w powstaniu publikacji określono w przedziale od 25% do 70%, co zostało potwierdzone w załączonych oświadczeniach pozostałych autorów publikacji. Należy podkreślić, że Doktorant ma wyjątkowo bogaty dorobek publikacyjny. Poza artykułami wykorzystanymi w dysertacji opublikował 5 artykułów naukowych w 2020 roku, oraz po 10 artykułów w 2022 i 2023 roku, przy czym aż w 15 publikacjach naukowych jest pierwszym autorem. Są wśród nich dwie prace przeglądowe w czasopiśmie *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* o współczynniku wpływu wynoszącym ok. 11 i 200 punktach MEiN. Na podkreślenie zasługuje również duża rozpoznawalność prac naukowych p. mgra Mateusza Kciuka. Jego publikacje z okresu 2020-2023 były już bowiem cytowane 714 razy (bez autocytowań), a wartość indeksu Hirscha wynosi 9.

Wnioski końcowe recenzji

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska p. mgr Mateusza Kciuka, przygotowana pod kierunkiem p. dr hab. Renaty Kontek i p. prof. dr hab. Mariusza Mojzycha, dotyczy aktualnych zagadnień naukowych. Uzyskane wyniki zostały zinterpretowane w oparciu o obserwacje własne, doświadczenia Zespołu oraz doniesienia literaturowe. Wątpliwości wyrażone w recenzji powinny zostać rozstrzygnięte w czasie obrony pracy doktorskiej.

Uważam, że rozprawa spełnia formalne wymogi stawiane pracom doktorskim przez postanowienia Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. W związku z tym, wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie p. mgra Mateusza Kciuka do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w tym do publicznej obrony przedłożonej dysertacji doktorskiej.

Jednocześnie uważam, że duża aktywność naukowa p. mgra Mateusza Kciuka, opisana szczegółowo powyżej, zasługuje na wyróżnienie.



/Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Czyż/

Łódź, 21 stycznia 2024 r