

Prof. dr hab. Monika Wujec
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin, 27.07.2022

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Kamili Buzun pt. ” Molekularny mechanizm aktywności
przeciwnowotworowej nowych pochodnych 4-tiazolidynonu”

Pani Kamila Buzun pracę doktorską wykonywała pod opieką dwóch promotorów: prof. dr hab. Anny Bielawskiej, kierownika Samodzielnej Pracowni Biotechnologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku oraz prof. dr hab. Romana Lesyka, kierownika Katedry Chemii Farmaceutycznej, Organicznej i Bioorganicznej Lwowskiego Uniwersytetu Medycznego. Praca ma charakter interdyscyplinarny. Wpisuje się doskonale w główny nurt badawczy chemii medycznej a mianowicie poszukiwanie nowych, skutecznych substancji mogących być w przyszłości lekami.

Praca doktorska Pani Kamili Buzun została przedstawiona do recenzji w formie cyklu czterech publikacji opublikowanych w latach 2020-2022, w czasopismach o łącznym współczynniku oddziaływania $IF = 21,311$, opatrzonych 30 stronicowym komentarzem. Prace mają charakter opracowań wieloautorskich. We wszystkich Doktorantka jest pierwszym autorem. Dołączone do komentarza oświadczenia wskazują na dominujący (51%) udział Doktorantki w wykonaniu badań eksperymentalnych oraz tworzeniu manuskryptów. Komentarz zawiera *Wykaz stosowanych skrótów*, *Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej*, *Wprowadzenie*, *Cel pracy*, opis badań (*Materiały i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja i podsumowanie*), *Literaturę*, *Streszczenie* w języku angielskim i polskim. Do komentarza dołączono publikacje oraz oświadczenia współautorów. Na końcu Doktorantka umieściła ankietę dorobku naukowego.

W części wprowadzającej Pani Kamila Buzun podaje krótką historię leczenia nowotworów, opisuje pochodne 4-tiazolidynonu, jako grupę związków chemicznych o różnorodnej aktywności biologicznej, w tym przeciwnowotworowej, charakteryzuje proces autofagii i apoptozy oraz wskazuje na topoizomerazy jako potencjalne cele molekularne dla leków przeciwnowotworowych.

Wstęp wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w dysertacji oraz uzasadnia wybór zarówno przedmiotu badań jak i ich zakresu.

Celem pracy było otrzymanie serii nowych pochodnych 5-[(Z,2Z)-2-chloro-3-(4-nitrofenylo)-2-propenylideno]-4-tiazolidynonu oraz zbadanie ich aktywności przeciwnowotworowej. W ramach prezentowanych badań na drodze syntezy otrzymano 48 pochodnych, używając jako substratów pochodnych 2,4-tiazolidynodionu, 2-tiokso-4-tiazolidynonu oraz (2Z)-2-chloro-3-(4-nitrofenylo)prop-2-enalu (*Ciminalum*). Reakcje prowadzono ogrzewając substraty w środowisku kwasu octowego z dodatkiem octanu sodu przez 3 godziny. Strukturę wszystkich otrzymanych połączeń potwierdzono metodami spektralnymi ^1H NMR, ^{13}C NMR, LCMS oraz analizą elementarną. Dla jednego związku kwasu 6-{5-[(Z,2Z)-2-chloro-3-(4-nitrofenylo)-2-propenylideno]-4-okso-2-tioksotiazolidyn-3-yl}heksanowego wykonano analizę rentgenostrukturalną. Następnie pięć spośród otrzymanych związków przekazano do badań w kierunku aktywności przeciwnowotworowej na panelu 60 linii komórek nowotworowych w NCI DTP (USA). Otrzymane wyniki badań wskazały na znaczącą aktywność przeciwnowotworową wszystkich związków w stosunku do linii komórek białaczek, nowotworów płuc, jelita grubego, ośrodkowego układu nerwowego, jajników, nerek, prostaty, piersi oraz czerniaków. Dla każdej linii komórkowej wyznaczono parametry GI_{50} , TGI oraz LC_{50} . Dwa spośród badanych związków z podstawnikami 4-hydroksyfenylowym oraz karboksyetylowym hamowały wzrost wszystkich linii nowotworowych w stężeniu submikro- i mikromolowym. Uzyskane wyniki badań pozwoliły na określenie zależności pomiędzy budową a aktywnością biologiczną. Stwierdzono, że fragment (2Z)-2-chloro-3-(4-nitrofenylo)prop-2-enowy w pozycji C5 pierścienia tiazolidynonu jest niezbędny dla aktywności przeciwnowotworowej. Ponadto, analizując budowę aktywnych połączeń *Ciminalum*-tiazolidynony zauważono, że równie ważny jest podstawnik w pozycji 3 pierścienia 4-tiazolidynonu. Pochodne zawierające kwasy karboksylowe oraz wspomniany wyżej podstawnik 4-hydroksyfenylowy były najbardziej aktywne. Brak podstawnika w pozycji 3 lub dodatkowe grupy w układzie pochodzącym od aldehydu skutkowały obniżeniem aktywności. Kolejnym etapem badań biologicznych było określenie aktywności cytotoksycznej w stosunku do linii komórek raka żołądka (AGS), jelita grubego (DLD-1) oraz dwóch linii nowotworów piersi MCF-7 oraz MDA-MB-231. Wszystkie badane związki okazały się aktywne wobec zastosowanych w badaniach liniach komórkowych. Najwyższą aktywnością charakteryzowały się dwa związki z podstawnikami karkoksyetylowym oraz karboksypentylowym, dla których wartości GI_{50} wobec linii nowotworów piersi zawierały się w przedziale 0,95-1,74 μM . Jednym z najczęstszych działań

niepożądanych zarówno leków przeciwnowotworowych, jak i kandydatów na leki jest brak selektywności wobec linii komórek nowotworowych. Wobec tego przeprowadzono również badania nowootrzymanyh związków na prawidłowych ludzkich limfocytach krwi. Pochodne charakteryzowały się niską cytotoksycznością oraz szerokim indeksem terapeutycznym dla linii komórkowych białaczek.

Kolejnym etapem pracy było zaprojektowanie oraz synteza nowej pochodnej: kwasu 2-[5-[(Z,2Z)-2-chloro-3-(4-nitrofenylo)-2-propenyliдено]-4-okso-2-tioksotiazolidyn-3-yl]-3-metylobutanowego. Strukturę i czystość nowej pochodnej potwierdzono spektroskopią magnetycznego rezonansu jądrowego, węglowego, spektrometrią mas oraz analizą rentgenostrukturalną. Otrzymany związek poddano poszerzonym badaniom biologicznym.

Badania aktywności prowadzono wobec dwóch linii komórek raka piersi (MCF-7 oraz MDA-MB-231) oraz linii komórek prawidłowych fibroblastów skóry. Oceny cytotoksyczności badanych związków dokonano zgodnie z metodą Carmichael'a, określając żywotność komórek hodowanych *in vitro* przy użyciu soli tetrazolowej (MTT). W badaniach zastosowano etopozyd jako lek referencyjny. W celu potwierdzenia, że badany związek hamuje proliferację komórek, oceniono jego wpływ na proces biosyntezy DNA. Właściwości antyproliferacyjne określono poprzez ocenę stopnia wbudowania [³H]tymidyny do DNA badanych komórek. Zbadano wpływ związku Les-3331 na indukcję procesu apoptozy, zmianę mitochondrialnego potencjału błonowego, ekspresję kaspaz inicjatorowych 8 i 9. Wyselekcjonowany związek znacząco wpływał na żywotność komórek obu badanych linii. Wartości IC₅₀ wynosiły 5,02 μM dla linii MCF-7 oraz 15,24 μM dla linii MDA-MB-231 podczas gdy dla komórek zdrowych 28,52 μM. Badanie wpływu pochodnej na proces apoptozy wskazało na zależną od dawki indukcję apoptozy zarówno na drodze zewnątrzpochodnej i jak i wewnątrzpochodnej. Zaobserwowano zwiększone hamowanie procesu wbudowywania [³H]tymidyny do DNA co świadczy o właściwościach antyproliferacyjnych badanego związku. Kolejno badano wpływ pochodnej Les-3331 na proces autofagii, sprawdzając stężenie LC3B, LC3A oraz Beclin-1. Nowa pochodna hamowała proces autofagii w obu liniach nowotworowych. Podjęto również próbę określenia mechanizmu działania przeciwnowotworowego nowej pochodnej. Badania *in silico* oraz badania enzymatyczne pozwoliły na stwierdzenie, że inhibicja topoizomerazy II jest prawdopodobnym mechanizmem działania przeciwnowotworowego związku Les-3331. Ostatnim etapem badań było poddanie nowego związku analizie ADME-Tox. Badania wykonano we współpracy z grupą badawczą prof. Jadwigi Handzlik z CM UJ w Krakowie. Określono możliwość przenikania przez błony biologiczne z użyciem systemu PAMPA,

stabilność metaboliczną z użyciem mikrosomów wątrobowych szczurzych, możliwość oddziaływań nowej pochodnej z innymi lekami oraz mutagenność.

Badania wykazały niską przepuszczalność bierną badanego związku. Można zatem przypuszczać, że zaangażowane są inne mechanizmy np. transport aktywny w celu osiągnięcia stężenia wewnątrz komórki koniecznego do wywołania efektu cytotoksycznego. Badany związek Les-331 wykazał umiarkowaną aktywność metaboliczną. Jako prawdopodobny szklak metaboliczny wskazano rozkład układu 2-tiokso-4-tiazolidynonu. W teście AMESA pochodna okazała się bezpieczna w niskim stężeniu, natomiast w wyższych wykazała wysokie ryzyko działania mutagennego. Wyniki te sugerują możliwe interakcje pomiędzy Les-3331 a DNA komórek nowotworowych. Przeprowadzone badania można a nawet powinny być kontynuowane. Należałoby przeprowadzić testy *in vivo* a także można zbadać związek Les-3331 na innych liniach nowotworów.

Podsumowując stwierdzam, że Doktorantka zrealizowała postawione cele badawcze. Metodologia przeprowadzonych badań nie budzi zastrzeżeń. Analiza wszystkich wyników badań pozwoliła na stwierdzenie, że związek Les-3331 jest potencjalnym lekiem przeciwnowotworowym, o wielokierunkowym mechanizmie działania. Prezentowane badania wzbogacają naszą wiedzę na temat budowy i syntezy pochodnych 4-tiazolidynonu jako nowych potencjalnych leków przeciwnowotworowych oraz stanowią nowe, ważne i oryginalne odkrycia. Jest to niezależny dorobek naukowy, w pełni spełniający wymagania dla rozpraw doktorskich.

W trakcie czytania pracy nasunęły mi się pytania na które chciałabym uzyskać odpowiedzi w trakcie obrony pracy doktorskiej:

1. Czym był podyktowany wybór związków do badań?
2. Czy w badaniach wstępnych był stosowany lek referencyjny?
3. Czy związek Les-3331 był zaprojektowany w oparciu o badania *in silico* czy na podstawie analizy SAR?
4. Czy były również próby syntezy i badań związków posiadających podstawniki karboksyalkilowe inne niż przedstawione w dysertacji?

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani Kamili Buzun pt. „Molecular mechanism of anticancer activity of novel 4-thiazolidinone derivatives”(tytuł oryginalny) charakteryzuje się istotnymi zaletami, do których należy zaliczyć adekwatną do postawionego celu metodykę, aktualność i wartość praktyczną uzyskanych wyników oraz wartościową dyskusję. Uwagę zwracają bardzo interesujące wyniki uzyskane w ramach dobrze zaprojektowanych celów i konsekwentnej pracy eksperymentalnej. Chciałabym

podkreślić również interdyscyplinarny charakter recenzowanej pracy doktorskiej. Obejmuje ona badania z zakresu chemii medycznej, syntezy organicznej, farmakologii i biochemii.

Na szczególną uwagę zasługuje pozostały dorobek Doktorantki. Pani Buzun jest współautorką jeszcze trzech publikacji w prestiżowych czasopismach o łącznym współczynniku oddziaływania równym 12,377. Ponadto, brała czynny udział w konferencjach naukowych, zarówno w Polsce (2), jak i za granicą (4). Ponadto, odbyła staż w zakresie technik ADME-Tox w Katedrze Technologii i Biotechnologii Leków CM UJ w Krakowie oraz miesięczny staż w Institut Gustave Roussy w Paryżu.

Rozprawa doktorska Pani Kamili Buzun w pełni spełnia wymagania stawiane tego typu rozprawom naukowym, dlatego wnoszę do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o nadanie mgr Kamili Buzun stopnia doktora nauk farmaceutycznych.