

Recenzja Rozprawy Doktorskiej

mgr Patryka Rurki

„New insight into multifaceted targeted therapy for treatment of glioblastoma multiforme”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana przez mgr Patryka Rurkę pod kierunkiem promotora – dr hab. Anny Mrozek-Wilczkiewicz, prof. UŚ oraz promotora pomocniczego – dr Katarzyny Malarz, prof. UŚ w Wydziale Nauk Ścisłych i Technicznych w Chorzowie, Instytutu Fizyki im. Augusta Chełkowskiego, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

Ocena układu, struktury podziału treści i kolejności rozdziałów rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska jest oparta na cyklu trzech prac doświadczalnych opublikowanych w pismach ze wskaźnikiem Impact Factor. Praca posiada klasyczny układ dla tego typu prac: wstęp (15 stron), założenia i cele pracy (2 strony), metodyka badań (5 stron), wyniki wraz z dyskusją opisane na 8 stronach oraz wnioski obejmujące 4 strony maszynopisu. Ponadto streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, oświadczenia autorów oraz piśmiennictwo liczące 105 pozycji. Praca liczy 145 stron oraz zawiera 6 rycin oraz 3 tabele ilustrujące zagadnienia podjęte w pracy. Rozprawa jest napisana w języku angielskim. Układ pracy jest przejrzysty, logiczny i czytelny, a przygotowany manuskrypt w sposób prawidłowy prezentuje zagadnienia związane z celowanym działaniem związków niskocząsteczkowych opartych na nowych pochodnych styrylochinazoliny oraz styrylochinazolinonu.

Merytoryczna ocena pracy doktorskiej

Leczenie nowotworów mózgu, a w szczególności glejaka wielopostaciowego, pomimo stosowanych strategii terapeutycznych oraz licznych badań klinicznych i przedklinicznych, nadal jest nieskuteczne. Obecnie leczenie glejaka opiera się na miejscowej resekcji guza z zachowaniem kluczowych obszarów mózgu, radioterapii oraz chemioterapii z zastosowaniem temozolomidu. Ograniczeniami w skuteczności prowadzonych terapii są częsta oporność komórek glejaka na chemioterapię i radioterapię, trudność w całkowitym usunięciu komórek nowotworowych, duża heterogenność komórek nowotworowych, a także trudność w docieraniu leków do mózgu poprzez obecność szczelnej bariery krew–mózg.

Należy również pamiętać, że guzy poza komórkami nowotworowymi tworzą komórki mikrośrodowiska, takie jak fibroblasty, komórki śródbłonne tworzące naczynia krwionośne czy komórki układu odpornościowego, takie jak makrofagi, limfocyty T, B, neutrofile, komórki NK. Cała taka struktura tworzy środowisko często immunosupresyjne i mocno wspierające wzrost nowotworów oraz ograniczające skuteczność stosowanych terapii.

Duże nadzieje wiąże się z niskocząsteczkowymi związkami specyficznie hamującymi lub aktywującymi szlaki sygnałowe nieprawidłowo funkcjonujące w patogenezie glejaka, takie jak

na przykład PI3K/AKT/mTOR związany z receptorem EGFR. Zastosowanie swoistych małowcząsteczkowych inhibitorów jest coraz częściej stosowane w terapii przeciwnowotworowej. Szczególnie duże znaczenie mają związki oparte na pierścieniu chinazolinowym. Przykładami takich cząsteczek są: gefitynib, afatynib, dakomytynib, które są swoistymi inhibitorami kinaz tyrozynowych zaakceptowanymi do zastosowań klinicznych.

Coraz więcej danych doświadczalnych wskazuje, że zastosowanie pojedynczego rodzaju terapii przeciwnowotworowej jest często w dłuższej perspektywie leczenia nowotworów nieskuteczne. Związane jest to z pojawianiem się oporności na zastosowany związek, pojawianiem się alternatywnych dróg aktywacji danej ścieżki sygnałowej, czy selekcjonowaniem komórek opornych na działanie stosowanej strategii przeciwnowotworowej.

Celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było zbadanie potencjału przeciwnowotworowego nowych pochodnych styrylochinazoliny oraz styrylochinazolinonu w leczeniu glejaka wielopostaciowego i innych typów nowotworów. W ramach badań zbadano pochodne z trzech grup związków: pochodną IS20 zawierającą grupę benzodioksołową, sulfonowane styrylochinazoliny (sześć związków: TS1-TS6) i styrylochinazolinony (cztery związki: W1A, W1B, W1C, W2B). Dla wszystkich testowanych związków określono szczegółowy mechanizm ich działania.

Cykl trzech prac w sposób wysoce spójny przedstawia właściwości przeciwnowotworowe trzech badanych grup związków, będących pochodnymi zawierającymi pierścień chinazolinowy, które są pochodnymi styrylochinazoliny oraz styrylochinazolinonu. W pierwszej pracy oceniono potencjał przeciwnowotworowy pochodnej o nazwie IS20. Wykazano, że pochodna ta hamowała ścieżkę sygnalizacyjną EGFR/mTOR w niekonwencjonalny sposób. Zahamowanie kinaz tyrozynowych ABL i SRC powodowało w konsekwencji zwiększenie stresu oksydacyjnego, zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M oraz śmierć komórek zarówno na drodze apoptozy jak i autofagii. Po raz pierwszy wykazano, że zastosowanie inhibitora IS20 powodowało zwiększenie stresu oksydacyjnego poprzez chelatowanie żelaza. Przedstawiono również mechanizm działania tego związku, który zwiększał ekspresję genu *Ndr1*, co wiązało się z zahamowaniem ścieżki sygnałowej EGFR/mTOR. Dodatkowo z wykorzystaniem modelu *in vivo* udowodniono bezpieczeństwo biologiczne badanego związku.

W drugiej pracy oceniono właściwości nowych sulfonowych pochodnych styrylochinazoliny, które hamowały podziały komórek nowotworowych glejaka i białaczki szpikowej. Badane związki powodowały zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M i zaburzoną polimeryzację mikrotubul, prowadząc do śmierci apoptotycznej oraz autofagii. Mechanizm działania wybranych 3 związków z tej grupy (TS1, TS3, TS5) polegał na interakcji z białkami związanymi z cyklem komórkowym, takimi jak Aurora A i cyklina B1 oraz zahamowaniu ścieżek sygnałowych związanych z EGFR/Akt/mTOR i EGFR/Ras. Udowodniono również swoistość wiązania badanych pochodnych w miejscu cewipabuliny tubuliny. Ostateczne dane wykazały skuteczne hamowanie wzrostu glejaka w modelu ksenoprzeszczepu u danio pręgowanego, szczególnie dla związku TS5. Jednak wykazano również, że zbyt duże stężenia

badanych pochodnych mogą powodować kardiotoxycyżność oraz zmiany fenotypowe u larw danio pręgowanego.

W trzeciej publikacji autor wykazał, że nowa pochodna styrylochinazolinonu W1B wykazuje właściwości przeciwnowotworowe w stosunku do komórek glejaka. Głównym celem działania tego związku jest wiązanie się z receptorem dla IGF1, choć obserwowane jest również hamowanie EGFR. Zauważono jednak, że wysokie stężenie glukozy, zresztą obserwowane również w guzach, zachowuje wyłącznie właściwości blokowania IGFR co osłabia efekt hamowania ścieżki Akt/mTOR i zmniejsza skuteczność badanych związków. Dlatego autor dodatkowo skojarzył działanie W1B z inhibitorem EGFR, dakomitynibem, co powodowało synergistyczne hamowanie wzrostu komórek glejaka. W pracy tej autor wykazał również, że związek W1B ma potencjał do pokonywania bariery krew–mózg, a w modelu *in vivo* danio pręgowanego udowodniono dobry profil bezpieczeństwa związku i silne działanie przeciwnowotworowe.

Wszystkie badane pochodne zawierające pierścień chinazolinowy wskazują na złożony mechanizm działania opierający się na hamowaniu kinaz tyrozynowych, hamowaniu cyklu komórkowego, zwiększaniu stresu oksydacyjnego czy zaburzeniu polimeryzacji mikrotubul podziałowych. Takie wielokierunkowe działanie ma zwiększyć powodzenie w niszczeniu komórek nowotworowych w złożonym mikrośrodoisku guza.

Szczegółowe etapy w każdej z przedstawionych prac były dobrze zaplanowane i prowadziły w konsekwencji do udowodnienia założonej hipotezy badawczej. Badania zaczynały się od wnikliwej analizy potencjału przeciwnowotworowego nowych pochodnych z pierścieniem chinazolinowym, następnie prowadzono syntezy związków i testowano ich potencjał przeciwnowotworowy *in vitro* na liniach komórek glejaka czy innych nowotworów. W kolejnym etapie rozprawy w każdej z publikacji oceniano drogę śmierci komórek nowotworowych oraz mechanizm działania takich pochodnych. W ostatnim etapie na modelu *in vivo* danio pręgowanego oceniano bezpieczeństwo biologiczne związków oraz w dwu publikacjach potencjał przeciwnowotworowy w stosunku do guzów glejaka rosnących w tym modelu. Wszystkie artykuły wskazują na znaczny potencjał przeciwnowotworowy testowanych pochodnych styrylochinazolinu i styrylochinazolinonu, mogący mieć znaczenie w ocenie ich potencjału w badaniach przedklinicznych jak i w dalszej kolejności badaniach klinicznych.

Merytorycznie i koncepcyjnie praca doktorska jest dobrze zaplanowana, zastosowano w niej imponujący panel dobrze dobranych technik potwierdzających na różnych płaszczyznach obserwowany efekt przeciwnowotworowy, a co ważne przedstawiono również mechanizm molekularny działania dla każdej z badanych pochodnych.

Wstęp pracy w sposób logiczny wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące niniejszej rozprawy doktorskiej oraz uzasadnia wybór podjętej tematyki badań. Autor dołożył dużej staranności w szczegółowym opisie dotyczącym nowotworów mózgu, w tym glejaka, oraz ich rodzajów. Bardzo dobrze przeanalizowano również profil molekularny poszczególnych rodzajów glejaków, co miało znaczenie w doborze linii komórkowych w dalszych etapach badań. Wstęp został podzielony na pięć części: pierwsza - poświęcona charakterystyce glejaka,

druga – sposobom leczenia glejaków, trzecia – heterogenności glejaków oraz wyzwaniach terapeutycznych, czwarta – przedstawia wrażliwość terapeutyczną glejaków związaną z dynamiką mikrotubul i homeostazą redoks oraz piąta opisuje pochodne chinazoliny jako obiecującą grupę związków w terapii celowanej.

Wstęp pracy jest dobrze napisany oraz zilustrowany czterema rycinami i jedną tabelą. Tabela przedstawia częstość mutacji różnych genów w glejakach. Ryciny przedstawiają schematy leczenia glejaków, ważną dla glejaków ścieżkę sygnałową PI3K/Akt/mTOR związaną z receptorem EGFR oraz dynamikę tworzenia mikrotubul w komórce.

Wstęp wskazuje celowość prowadzonych badań oraz dobór testowanych pochodnych styrylchinazoliny i styrychinazolinonu w leczeniu glejaka.

Założenia i cele pracy, jakie postawił sobie autor, są nowatorskie i jasno sformułowane. Celem jest zbadanie nowych pochodnych styrylchinazoliny i styrychinazolinonu w leczeniu glejaka. Bardzo dobrze przedstawiono etapy prowadzonych badań i analiz. Cele szczegółowe przedstawiają duży zakres prowadzonych eksperymentów z użyciem zróżnicowanych technik badawczych. Choć zabrakło w opisie uwzględnienia badań *in vivo* w stosowanej metodologii.

W rozdziale poświęconym **materiałom i metodom** starannie opisano zastosowane metody badawcze. Opisane metody badawcze są skróconą wersją bardzo szczegółowego opisu prowadzonych badań z użyciem różnych technik, zawartych w dołączonych pracach oryginalnych autora. Metody badawcze są dobrze dobrane i zróżnicowane, aby wykazać właściwości przeciwnowotworowe badanych pochodnych styrylchinazoliny i styrychinazolinonu, a także mechanizm molekularny ich działania, bezpieczeństwo biologiczne i skuteczność w modelu przedklinicznym *in vivo*. Zakres stosowanych technik obejmuje syntezy badanych pochodnych, hodowle komórkowe, analizy cytotoksyczności, zahamowania cyklu komórkowego, określenie rodzaju śmierci komórkowej. Dodatkowo zbadano dynamikę polimeryzacji mikrotubul, zmiany w potencjale redoks i chelatowania żelaza. Dla wyjaśnienia molekularnego mechanizmu działania testowanych pochodnych określono profil ekspresji wybranych genów oraz zmiany w ekspresji białek. Wszystkie wyniki poddano starannej analizie statystycznej z użyciem odpowiednich testów. Mimo iż autor nie wykonywał badań *in vivo*, krótki opis badań na modelu danio przegowanego ułatwiłby ocenę uzyskanych wyników.

W części Wyniki oraz Dyskusja rzetelnie opisano uzyskane wyniki oraz przeprowadzono dyskusję. Niestety, w pracy zabrakło szczegółowego odniesienia uzyskanych wyników do prac innych autorów, co powinno być standardem w dyskusji. W rozprawie uzyskane wyniki z trzech opublikowanych prac posegregowano ze względu na rodzaj zastosowanej metody badawczej dla trzech nowych pochodnych zawierających pierścień chinazolinowy, co pozwoliło zapanować nad ilością i jasnością uzyskanych danych.

Wyniki opisano zgodnie z opublikowanymi danymi. W pierwszej części wykazano właściwości cytotoksyczne i cytostatyczne trzech badanych związków: sfunkcjonalizowanym benzodioksolem IS20, sulfonowane styrylochinazoliny TS1-TS6 oraz pochodne styrychinazolinonu W1A, W1B, W1C, W2B. Uzyskane wyniki wskazują na specyficzne dla komórek glejaka oraz białaczki szpikowej właściwości antyproliferacyjne IS20. Związek ten,

w przeciwieństwie do klasycznych związków alkilujących, preferencyjnie wpływał na komórki glejaka z wadliwym genem p53 lub niesprawnym procesem apoptozy. Dla drugiej grupy związków wykazano, że najbardziej aktywny był związek TS5, nieco mniej pochodne TS1, TS2 TS3, TS4, natomiast pozostałe posiadały słabe właściwości cytotoksyczne. Dla tej grupy związków wykazano swoistość działania na komórki glejaka, ponieważ nie obserwowano toksyczności dla komórek raka wątroby HepG2, a także zmniejszoną toksyczność dla prawidłowych astrocytów. W ostatniej grupie testowanych pochodnych udowodniono, że tylko jeden z nich, W1B, posiadał silne właściwości hamujące wzrost komórek glejaka. W tej części przedstawiono również wyniki bezpieczeństwa nowych pochodnych na modelu *in vivo* danio pręgowanego. Uzyskane wyniki wskazują na duże bezpieczeństwo biologiczne związku IS20 oraz W1B. Natomiast dla związków z grupy TS obserwowano kardiotoxyczność oraz zmiany fenotypowe. Dla dwu badanych grup związków, z serii TS oraz W1B wykazano znaczne zahamowanie wzrostu guzów glejaka rosnących *in vivo*.

W pracy doktorskiej wykazano, że podstawowym mechanizmem działania dla związków z serii TS, szczególnie pochodnej TS5 oraz związku IS20, było blokowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M. Dodatkowo pokazano, że dla związku IS20 mechanizm blokowania cyklu komórkowego polegał na chelatowaniu jonów żelaza i uwalnianiu wolnych rodników tlenowych. Natomiast związki z grupy TS (TS1, TS3, TS5) dodatkowo zaburzały polimeryzację tubuliny, prowadząc do apoptozy komórek nowotworowych.

Autor udowodnił również zahamowanie ścieżek sygnałowych EGFR i Akt/mTOR dla związków IS20 oraz pochodnych z grupy TS, natomiast dla związku W1B wykazano znaczne zahamowanie ścieżki sygnałowej związanej z IGF1R, która odpowiada za metabolizm glukozy. Ponadto dla pochodnej W1B przedstawiono synergistyczne działanie cytotoksyczne z innym inhibitorem białka EGFR, dakomitynibem.

Autor wykazał również zaburzenia homeostazy redoks dla związku IS20, co w konsekwencji prowadziło do śmierci komórkowej na drodze apoptozy i autofagii. Natomiast związek TS5 indukował śmierć komórek na drodze apoptozy. Dla związku W1B nie przedstawiono mechanizmu śmierci komórek nowotworowych.

Autor rozprawy słusznie zauważa i wskazuje, że tylko zastosowanie związków o wielokierunkowym działaniu może przynieść znaczący efekt terapeutyczny. Stosowane monoterapie są mniej skuteczne i często powodują aktywację alternatywnych ścieżek sygnałowych. Dlatego tylko racjonalnie zaplanowana kombinacja może przynieść skuteczne zahamowanie lub eliminację komórek nowotworowych.

Podsumowując, rezultaty przeprowadzonych badań zostały prawidłowo przedstawione, zinterpretowane i zaprezentowane. Zabrakło jednak odniesienia do światowej literatury w przedstawionych wynikach i rozbudowanej dyskusji. Uzyskane wyniki prezentują znaczące właściwości przeciwnowotworowe testowanych pochodnych styrylchinazolinu i styrylchinazolinonu, a po przeprowadzeniu odpowiednich badań przedklinicznych mogą mieć duże kliniczne znaczenie aplikacyjne.

Wymienione w części kończącej rozprawę **wnioski** są jasno i adekwatnie sformułowane i wskazują na wielokierunkowe działanie testowanych związków. Autor pokusił się również

o wskazanie najbardziej obiecujących pochodnych dla każdej z testowanych grup związków i wskazał IS20, TS5 i W1B. W podsumowaniu autor przedstawił również potencjalne znaczenie kliniczne testowanych związków oraz kierunki, które w przyszłości mogą być rozwijane. Doktorant wskazał również ograniczenia badanych związków i przedstawił sposoby ich rozwiązania, co świadczy o rzetelności przedstawionych danych.

Uwagi i zapytania do pracy:

1. W pracy IS20 nie pokazano wpływu związku na linie komórek prawidłowych. Czy wiadomo, jaka była toksyczność tego związku w stosunku do komórek prawidłowych?
2. Autor słusznie zauważa, że poza właściwościami cytotoksycznymi czy cytostatycznymi badanych związków ważne jest określenie ich farmakodynamiki, w tym przekraczanie bariery krew–mózg. Jako że badane są związki wykazują działanie przeciwko komórkom glejaka, czy wiadomo o ich możliwości pokonywania bariery krew–mózg?
3. W rozprawie nie przeprowadzono prawidłowo dyskusji, ponieważ nie odniesiono się do wyników innych autorów i nie wskazano odnośników literaturowych do nich. W dyskusji zabrakło mi bardziej dokładnego porównania skuteczności nowych badanych pochodnych do tych już znanych jak np.: gefitynib, afatynib, dakomitynib, co wykazałoby ich wyższość nad tymi stosowanymi w klinice.
4. Uzyskane dane *in vitro* wskazują na duży potencjał przeciwnowotworowy nowych pochodnych. Naturalnym krokiem jest zatem zbadanie ich skuteczności w modelu przedklinicznym np. na mysich modelach glejaków. Takie eksperymenty na modelu myszy immunokompetentnych poza bezpośrednim działaniem na komórki nowotworowe mogą wskazywać na jeszcze większą ich skuteczność ze względu na aktywację komórek układu odpornościowego. Czy widzi Pan możliwość takiego działania badanych pochodnych i czy planowane są tego typu eksperymenty?
5. Który z badanych związków jest najbardziej obiecujący do zastosowań klinicznych?
6. Praca została niezwykle starannie przygotowana pod względem językowym i nie odnotowano żadnych błędów. Z obowiązku recenzenta chciałbym zaznaczyć, że nie rozwinęto wszystkich skrótów stosowanych w pracy, a jedynie wybrane. Jednak takie niedopatrzenie nie umniejsza wartości pracy.

Wniosek

Podsumowując moją ocenę, stwierdzam, że pod względem wartości merytorycznych niniejsza rozprawa doktorska prezentuje bardzo wysoki poziom.

W mojej ocenie mgr Patryk Rurka wykazał skuteczność działania przeciwnowotworowego nowych pochodnych w swoistym niszczeniu komórek glejaka, a uzyskane wyniki wskazują na potencjalne zastosowanie uzyskanej wiedzy w praktyce klinicznej. Autor zrealizował postawione cele badawcze, a uzyskane wyniki opublikował w renomowanych czasopismach międzynarodowych. Przedstawiona rozprawa doktorska i wysoce spójny cykl prac doświadczalnych świadczą o dużej wiedzy merytorycznej, opanowaniu zastosowanych metod badawczych, umiejętności analizy uzyskanych wyników, wyciągania odpowiednich wniosków oraz dojrzałości naukowej. Przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim przewidziane w ustawie

z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (aktualne odniesienie do ustawy - tekst jednolity: Dz. U. z 2023 r. poz. 742).

Przedkładam zatem wniosek do Wysokiej Rady o dopuszczenie Pana Patryka Rurki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo, ze względu na wysoką jakość przedstawionej pracy oraz spełnienie wszystkich wymaganych warunków, wnoszę o **wyróżnienie** przedłożonej rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem

dr hab. n.med. Ryszard Smolarczyk

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie

Państwowy Instytut Badawczy

Oddział w Gliwicach

Zakład Radiofarmacji i Obrazowania Przedklinicznego PET

ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15

44-102 Gliwice