



*KATEDRA I ZAKŁAD PATOFIZJOLOGII
UNIwersytetu Medycznego w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin
tel.: +48-81-448-65-00
fax: +48-81-448-65-01
kierownik: prof. zw. dr hab. n. med. Stanisław J. Czuczwar
czuczWarsj@yahoo.com*

Recenzja rozprawy doktorskiej „Ocena właściwości biologicznych nowych pochodnych 2-amino-1,3,4-tiadiazolu w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*” wykonanej przez mgr Małgorzatę Juszcak w Zakładzie Biologii Medycznej Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie pod kierunkiem prof. Wojciecha Rzeskiego

Pochodne tiadiazolu oferują szeroką gamę aktywności farmakologicznej – opisano ich działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze, przeciwdrgawkowe, przeciwzapalne oraz przeciwwirusowe. Ponadto pochodne tiadiazolu znajdują zastosowanie jako środki ochrony roślin. W piśmiennictwie jest także szereg przykładów dla przeciwnowotworowego działania związków z tej grupy.

Choroby nowotworowe wciąż stanowią jedną z głównych przyczyn umieralności a ich chemioterapia jest związana z istotnymi objawami niepożądanymi. Dlatego też trwają poszukiwania związków o większej skuteczności przeciwnowotworowej z jednoczesnym mniejszym profilem efektów niepożądanych. Badania Doktorantki wpisują się całkowicie w ten nurt, jako że poddała ocenie dwie nowe pochodne 2-amino-1,3,4-tiadiazolu, CIABT i 4BrABT, pod kątem ich działania przeciwnowotworowego oraz ich ewentualnych efektów neuroprotekcyjnych. Przeprowadzono badania właściwości antyproliferacyjnych tychże związków, włączając mechanizmy wykorzystywane w tych właściwościach w badaniach *in*

vitro. Warto jest zaznaczyć, iż przeprowadzono także doświadczenia in vivo do oceny działania przeciwnowotworowego i toksycznego badanych związków. Określono także ich farmakokinetykę.

Oceniana rozprawa liczy 155 stron wydruku komputerowego, zawiera 31 rycin oraz 20 tabel a także liczy 278 pozycji piśmiennictwa, w zdecydowanej większości anglojęzycznego. Wstęp, na blisko 32 stronach wydruku, został napisany rzeczowo i odnosi się do rzeczywistości problemów, które należało poruszyć. Doktorantka nie starała się zwiększyć objętości tego rozdziału poprzez przedstawianie problemów niezwiązanych merytorycznie z tematem rozprawy. Po krótkim i właściwym uzasadnieniu konieczności poszukiwania nowych strategii przeciwnowotworowych, mgr Juszcak przechodzi do pochodnych tiadiazolu, koncentrując się m.in. na ich charakterystyce fizyko-chemicznej oraz już istniejących lekach. Omawia ich aktywność farmakologiczną, poświęcając dużo miejsca ich działaniom przeciwnowotworowym. Zwraca uwagę fakt, iż większość piśmiennictwa na ten temat pochodzi z ostatnich kilku lat. O ile danych doświadczalnych jest stosunkowo dużo, co do działania przeciwnowotworowego, to badań klinicznych z użyciem pochodnych jest znacznie mniej i generalnie ich wyniki nie są zachęcające. Ograniczone efekty terapeutyczne obserwowano jedynie u kilku procent pacjentów. W trakcie charakterystyki mechanizmów działania pochodnych z tej grupy, Doktorantka wymieniła szereg receptorów, enzymów a także wskazała na ich działanie antyoksydacyjne, przeciwwagregacyjne i przeciwdziałające hiperlipidemii. Wstęp kończy przegląd ewentualnych zastosowań pochodnych tiadiazolu, o czym już wspomniałem we wcześniejszym fragmencie recenzji.

Rozdział Materiał i Metody został opracowany bardzo starannie na blisko 19 stronach wydruku komputerowego. Doktorantka zestawiała wszystkie odczynniki, bufory i przeciwciała zastosowane do badań. Opis badań in vitro otwiera zestawienie komórek nowotworowych i prawidłowych użytych do hodowli komórkowych oraz sposób prowadzenia hodowli.

Następnie przedstawiono szereg zastosowanych metod, m.in. oznaczanie żywotności komórek nowotworowych, określanie syntezy DNA, Western blotting i in. W doświadczeniach in vivo wywoływano guzy nowotworowe u szczurów, przeprowadzono badanie dystrybucji stosowanych związków w tkankach szczura oraz oznaczono aktywność przeciwnowotworową CIABT.

Wyniki na blisko 40 stronach wydruku są bogato ilustrowane w części kolorowymi rycinami, kolorowymi zdjęciami i tabelami. W skrócie, oba badane związki hamowały proliferację komórek nowotworowych ale CIABT nie powodował apoptozy w komórkach nowotworowych. Co do mechanizmu działania wydaje się, iż substancja ta powodowała zahamowanie szlaku przekazywania sygnału ERK1/2, blokując przejście cyklu komórkowego z fazy G1 do S. Stężenia odpowiedzialne za efekt antyproliferacyjny nie wykazywały efektów toksycznych wobec komórek prawidłowych. Co niezwykle ciekawe, obserwowano nawet efekt neuroprotektyny w warunkach ekspozycji komórek na czynniki neurotoksyczne. Badania in vivo prowadzono z zastosowaniem minipomp osmotycznych. W dawce 10 mg/kg, CIABT nie wpływał na wzrost guzów nowotworowych wywołanych podaniem komórek glioma C6. Z drugiej strony nie powodował istotnych efektów niepożądanych.

Omówienie wyników Doktorantka rozpoczyna od krótkiego podsumowania wyników, wskazując na działanie antyproliferacyjne badanych związków oraz obserwowany efekt neuroprotektyny. Zanalizowała prawidłowo także fakty wskazujące na zaangażowanie konkretnych dróg przekazywania sygnału w działanie antyproliferacyjne. Następnie dokonała porównania uzyskanych wyników w badaniach in vitro do danych zawartych w dostępnym piśmiennictwie. Ciekawe są przypuszczenia Doktorantki wobec rozbieżności wyników własnych (stwierdzono brak apoptozy) z wynikami innej publikacji. Zdaniem mgr Juszcak decydujące znaczenie mogą mieć w tym wypadku różne podstawniki przy pierścieniu tiadiazolowym, które w różny sposób mogą warunkować aktywność farmakologiczną

badanych pochodnych tiadiazolu. Omówienie badań in vivo Doktorantka rozpoczęła od przedstawienia głównych faktów dotyczących farmakokinetyki CIABT. Substancja ta penetruje do wszystkich narządów i tkanek, w tym także nowotworowej – czas osiągnięcia maksymalnego stężenia w nich wynosił 15 minut i jedynie w mózgu czas ten osiągnął 30 minut. Krótkie czasy do wystąpienia stężenia maksymalnego oraz szybka eliminacja CIABT z organizmu (do maksymalnie 4 godzin w odniesieniu do wątroby) skłoniła mgr Juszcak do zastosowania pomp osmotycznych, które zapewniają stałe stężenie leku podczas np. dwóch tygodni. W dawce 10 mg/kg CIABT aplikowany przy pomocy pomp osmotycznych przez dwa tygodnie nie wpłynął jednak na masę guzów. Doktorantka zdaje sobie sprawę z rozbieżnościami pomiędzy uzyskanymi wynikami in vitro i in vivo i tłumaczy je ograniczeniem stosowanej dawki CIABT do 10 mg/kg. Z drugiej strony przytacza szereg dowodów z piśmiennictwa na brak działania przeciwnowotworowego pochodnych tiadiazolu w modelach doświadczalnych in vivo. Są jednak także dane przeciwne, również cytowane przez mgr Juszcak. Bardzo interesująca jest część dyskusji poświęcona własnościom neuroprotektynym 4BrABT w sytuacji obecności toksycznego stężenia glutaminianu. Doktorantka rozważa intrygującą opcję ewentualnego zastosowania tej substancji z uznanym lekiem przeciwnowotworowym – w takiej sytuacji mogłyby się sumować efekty antyproliferacyjne a 4BrABT mógłby chronić neurony przed neurotoksycznymi efektami leku przeciwnowotworowego. Warta rozważenia jest także koncepcja stosowania badanych pochodnych tiadiazolu jako leków neuroprotektynych w chorobach neurodegeneracyjnych wieku podeszłego. Rozprawę kończy 6 wniosków, z których ostatni ma charakter wniosku generalizującego uzyskane wyniki. Pozostałe są krótkim i jasnym podsumowaniem wyników badań.

W trakcie zaznajamiania się z tą niewątpliwie interesującą rozprawą nasunęło mi się kilka uwag:

1. Str. 18, ryc. 2 – błędnie podano nazwy leków: acetazolamidu i metazolamidu
2. Na str. 36 podano wartości ED50 w postaci przedziałów dawek, co nie jest właściwe
3. Str. 51-52 – przedstawiono opis syntezy badanych związków. Czy Doktorantka brała udział w tym procesie? Jeśli nie, to ten opis nie powinien występować w Metodycie
4. Str. 62 – doświadczenia przeprowadzono na szczurach szczepu a nie rasy Wistar
5. Str. 89 – powinno być: zwierzęta podzielono na grupy kontrolną i badaną
6. Legenda ryc. 21 i innych – rzeczywiście przyjęto poziom istotności na $p < 0,005$?
7. Str. 115 – błędnie podano nazwisko prof. Kostowskiego

Przytoczone powyżej uwagi nie ograniczają wysokiego poziomu merytorycznego ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej. Doktorantka stosowała m.in. nowoczesne metody biologii molekularnej, uzyskała szereg interesujących wyników i dokonała rzetelnej oraz krytycznej ich oceny w oparciu o nowe i prawidłowo dobrane pozycje piśmiennictwa. Bardzo dobra dokumentacja graficzna (w tym dobrej jakości zdjęcia) robią bardzo pozytywne wrażenie. Poza tym część wyników niniejszej dysertacji doktorskiej została opublikowana w uznanych czasopismach międzynarodowych. Dlatego też zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Małgorzaty Juszcak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie tej stojącej na wysokim poziomie merytorycznym rozprawy.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Patofizjologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Prof. dr hab. Stanisław Czuczwar

Lublin, 2016-12-01