

**KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII**  
**Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej**  
**Uniwersytet Medyczny w Lublinie**

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka  
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b; tel. +48 81448 7400; e-mail: jaroslaw.dudka@umlub.pl

---

*Prof. zw. dr hab. n. med. Jarosław Dudka*

Lublin, dnia 1 grudnia 2017 r.

**Ocena**

rozprawy doktorskiej mgra farmacji MIŁOSZA JAKUBA REGULSKIEGO, pt. „POCHODNE  
*TRANS-STILBENU* I *TRANS-STILBAZOLU* JAKO SELEKTYWNE INHIBITORY  
AKTYWNOŚCI CYKLOOKSYGENAZY-2 (COX-2) O WŁAŚCIWOŚCIACH  
PRZECIWNOWOTWOROWYCH I CHEMOPREWENCYJNYCH” napisanej w Katedrze i  
Zakładzie Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu pod  
kierunkiem prof. dr hab. n. farm. Marka Muriasa. Promotor pomocniczy: dr hab. n. farm. Hanna  
Piotrowska-Kempisty

Rozprawa doktorska dotyczy poszukiwania nowych związków o aktywności przeciwnowotworowej w odniesieniu do raka piersi. Za cel molekularny dla tych związków obrano cyklooksygenazę-2, a weryfikację hipotezy badawczej przeprowadzono w oparciu o analizę *in silico* i testy *in vitro*.

Autor oparł założenia pracy na fakcie iż, COX-2 jest uważany za kluczowy enzym biorący udział w procesach zapalnych oraz, w będącej w bardzo wielu przypadkach ich następstwem, transformacji nowotworowej, ponadto na tym, iż COX-2 uczestniczy w wielu etapach onkogenezy, takich jak: proces inicjacji, angiogeneza, metastaza, jak również procesy hamujące indukcję apoptozy. Dodatkowym zamiarem było uzyskanie związków o lepszej biodostępności, niż dotychczas stosowane.

Choroby nowotworowe obok chorób układu krążenia stanowią niezmiennie od wielu lat główną przyczynę zgonów zarówno w populacji światowej jak i populacji polskiej, a rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym kobiet w Polsce i stanowi główną przyczynę ich umieralności z powodu nowotworów - rocznie odnotowuje się około 5000 zgonów. Można zaobserwować olbrzymi postęp technologiczny w diagnozowaniu chorób nowotworowych, poznaniu ich patomechanizmu, ale postęp w terapii nowotworów mierzony odsetkiem 5-cio letnich przeżyć jest wciąż dla wielu nowotworów niezadawalający. Ponadto nowoczesne leki do immunoterapii i terapii celowanej nowotworów są bardzo drogie i mogą stanowić problem medyczny i społeczny ze względu na barierę ekonomiczną. Zachodzi zatem potrzeba równoległego kontynuowania poszukiwań nowych chemioterapeutyków o dużej selektywności działania, tj.

**KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII**  
**Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej**  
**Uniwersytet Medyczny w Lublinie**

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka  
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b; tel. +48 81448 7400; e-mail: jaroslaw.dudka@umlub.pl

---

takich, które będą wykazywać skuteczność terapeutyczną przy mniejszej toksyczności. Z tego względu tematykę pracy doktorskiej Pana mgra MIŁOSZA JAKUBA REGULSKIEGO należy uznać za bardzo aktualną i wartościową, a temat za wybrany trafnie i uzasadniony.

Oceniana rozprawa została przygotowana zgodnie z zasadami przyjętymi dla tego typu opracowań. Wyróżnia się jednak znacznie większą objętością niż typowe prace o podobnej tematyce z tej dziedziny naukowej. Liczy ona 316 stron, na których zawarto łącznie 67 rycin, 38 tabel i 67 wykresów. Układ jest typowy dla eksperymentalnych rozpraw doktorskich. Poza wstępem, zawartym na dwóch stronach składa się z części teoretycznej i doświadczalnej, oraz Wyników i Dyskusji. Ta część kończy się rozdziałem Podsumowanie i Wnioski. W pracy zawarto również wykaz piśmiennictwa, a także wykaz skrótów, spis rycin, tabel i wykresów oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

Mimo znacznej objętości, pracę czyta się bardzo dobrze, jest ona zredagowana w bardzo logiczny, jasny i merytorycznie poprawny sposób. Trudno jest zaproponować redukcję objętości tekstu, bo każdy fragment stanowi ważną część całości. Autor dołożył wszelkich starań, aby czytelnik, nawet niebędący specjalistą z tej dziedziny, mógł w pełni zrozumieć celowość podejmowanych działań. Praca napisana jest z dużą precyzją słowa i dbałością o szczegóły, co pozwala na stwierdzenie, że Autor jest osobą bardzo dokładną i konsekwentną w swoich działaniach.

Tytuł rozprawy jest ogólny, lecz poprawny i adekwatny do celu pracy i zakresu przeprowadzonych badań. Wydaje się, że mógłby być jeszcze uzupełniony o informację, że badania odnoszą się do komórek raka piersi.

Wprowadzeniem do rozprawy jest liczący dwie strony Wstęp oraz Część teoretyczna opisana na 64 stronach. We Wstępie, gdzie budowane są fundamenty założeń pracy, zabrakło odniesień literaturowych, które byłyby pomocne w ocenie ich istotności. Autor zapewne potraktował ten rozdział jako streszczenie, w którym rzeczywiście nie podaje się odwołań do literatury, jednak streszczenie stanowi integralną część pracy zamieszczoną w końcowej części dysertacji. Podbudowa literaturowa założeń została podana w Części teoretycznej, lecz odszukanie jej stanowi pewne utrudnienie. W części teoretycznej została opisana problematyka ściśle związana z postawioną hipotezą badawczą. Obszerność części teoretycznej uzasadniona jest szerokim spektrum poruszanych zagadnień. Autor opisał bowiem budowę i funkcje molekularnego celu

**KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII**  
**Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej**  
**Uniwersytet Medyczny w Lublinie**

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka  
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b; tel. +48 81448 7400; e-mail: jaroslaw.dudka@umlub.pl

---

badań, tj. enzymu cyklooksigenazy-2, rolę produktów aktywności enzymu oraz inhibitory – COX-2 – koksyby i pochodne *trans*-stilbenu; Dużo uwagi poświęcił powiązaniu stanu zapalnego z powstawaniem nowotworu; Opisał metody i zastosowania analizy QSAR i dokowania oraz podał opis aktualnych metod służących do oznaczania aktywności cytotoksycznej leków w warunkach *in vitro*. W części tej Autor wykazał się bardzo dobrą znajomością wysoce specjalistycznej problematyki z zakresu badań *in silico* projektowania struktury chemicznej leków, badań cytotoksyczności *in vitro*, biochemii, biologii molekularnej, analityki medycznej i onkologii. Ta część dysertacji zakończona została jasno sprecyzowanym celem pracy, którym jest ocena działania przeciwnowotworowego nowosyntetyzowanych na potrzeby niniejszych badań pochodnych *trans*-stilbenu oraz *trans*-stilbazolu, poprzez analizę ich właściwości cytotoksycznych w stosunku do linii komórek raka piersi oraz zdolności do hamowania procesu zapalnego. Autor umieścił założenia i cel badań w rozdziale pt, Części Doświadczalna. Wydaje się, że wydzielenie tych zagadnień w osobny rozdział byłoby celowe. Ponadto jednym z założeń/przesłanek podjętych badań jest uzyskanie inhibitorów COX-2 o lepszej biodostępności niż inhibitory już znane. Ten aspekt nie był jednak badany w pracy. Stanowi zatem ciekawy temat dalszych badań nad wyselekcjonowanymi przez Autora związkami o optymalnej aktywności i selektywności działania hamującego COX-2.

Autor bardzo starannie zaplanował i wykonał doświadczalną część pracy. Z dużą starannością z rozbiciem na podrozdziały opisał każdy etap badań. Etapy badań stanowią zwarty, logiczny ciąg: na wstępie określona została siła i selektywność hamowania COX-1 i COX-2 przez pochodne *trans*-stilbenu i *trans*-stilbazolu poprzez wykonanie badania przesiewowego *in vitro* z zastosowaniem kompetycyjnego testu immunoenzymatycznego (c-EIA); Doktorant wytypował najbardziej selektywne inhibitory COX-2 na podstawie badania przesiewowego oraz wyznaczył wartości  $IC_{50}$  tych związków wobec obu izoform COX; wykonał badania *in silico* (2D QSAR) w oparciu o uzyskane dane eksperymentalne i dane literaturowe w celu wyznaczenia zależności struktura – aktywność oraz określenia fragmentów budowy odpowiedzialnych za pożądaną efekt biologiczny; zaprojektował nowe związki w oparciu o uzyskane wyniki analizy komputerowej; określił przewidywaną aktywność biologiczną i wytypował najbardziej aktywne związki do kolejnych badań eksperymentalnych; przeprowadził syntezę chemiczną wyselekcjonowanych związków i potwierdził ich tożsamość za pomocą metod klasycznych i spektroskopowych; wyznaczył wartości  $IC_{50}$  nowych związków wobec obu izoform COX za pomocą testu c-EIA; przeprowadził półilościową analizę zależności struktura – aktywność (tzw. naiwny model Bayesa) z

**KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII**  
**Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej**  
**Uniwersytet Medyczny w Lublinie**

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka  
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b; tel. +48 81448 7400; e-mail: jaroslaw.dudka@umlub.pl

---

wykorzystaniem danych doświadczalnych i literaturowych – określił fragmenty budowy odpowiedzialne za pożądany efekt biologiczny oraz porównał wyniki z badaniem 2D QSAR; określił właściwości cytotoksyczne nowych związków oraz cząsteczek wytypowanych w badaniach przesiewowych wobec komórek raka piersi MCF-7. Metody zostały opisane w sposób merytorycznie poprawny i precyzyjny, co pozwala na powtórzenie badań w innych laboratoriach. Warto podkreślić bogaty warsztat metodyczny i współpracę Doktoranta w zakresie syntezy związków, badań QSAR i dokowania związków. Mimo, że Autor nie jest ekspertem w obszarach wiedzy z tego zakresu, opis metodyki, a później interpretacja wyników, pozwalają stwierdzić, że czuje się w tej tematyce swobodnie, rozumie ją i potrafi w jasny, logiczny i syntetyczny sposób przekazać swoją wiedzę czytelnikowi. Z uwag krytycznych należy podkreślić, iż badania cytotoksyczności przeprowadzone jedynie testem MTT są orientacyjne. Warto dla związków o największej aktywności przeprowadzić badania mikroskopowe i/lub zastosować dodatkowy test o innym mechanizmie działania.

Otrzymane wyniki świadczą, że postawiony cel badawczy został zrealizowany. Dokładny, logiczny i jasny opis uzyskanych rezultatów zawarty jest na 76 stronach dysertacji. Ponadto, w suplemencie dodatkowo Doktorant opisał szczegóły metodyki badań i wyników. Sprawą dyskusyjną są korzyści takiego podzielonego na dwie części opisu. Analityczne podejście do opisu wyników świadczy o należyтым przygotowaniu Autora do wieloaspektowego zakresu problemu badawczego podjętego w pracy doktorskiej. Do najważniejszych wyników uzyskanych w niniejszych badaniach zliczam wykazanie działania cytotoksycznego 4-nitro-3',4',5'-trihydroxy-*trans*-stilbenu oraz 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy-*trans*-stilbenu. Obydwa związki w stężeniu 12,5  $\mu\text{mol/l}$  spowodowały ponad 30% obniżenie żywotności komórek, co spełnia kryteria cytotoksyczności wg standardów ISO. Istotne jest również to, że siła działania obydwóch związków była podobna, pomimo wcześniej wykazanych znacznych różnic w bezpośrednim hamowaniu aktywności COX-2. Otwiera to dyskusję nad innymi mechanizmami poza hamowaniem COX-2. A zatem, czy nie warto przebadać cytotoksyczności otrzymanych syntetycznie związków w stosunku do komórek nowotworowych, mimo że okazały się słabymi inhibitorami COX-2?

Rozdział Dyskusja mimo dużej ilości uzyskanych wyników jest napisany jasno i stanowi zwartą, logiczną całość, co wskazuje na zdolność syntetycznego ujęcia problemu. Autor w tym

**KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII**  
**Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej**  
**Uniwersytet Medyczny w Lublinie**

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka  
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b; tel. +48 81448 7400; e-mail: jaroslaw.dudka@umlub.pl

---

rozdziale koncentruje się na interpretacji uzyskanych wyników, głównie z obszaru badań *in silico* oraz hamowania i selektywności działania w stosunku do COX-2, w konfrontacji z wynikami badań innych autorów. Nieco więcej uwagi można było poświęcić w dyskusji wpływowi badanych związków na zmiany żywotności komórek raka piersi.

Wnioski są napisane w sposób precyzyjny, w ścisłym powiązaniu z otrzymanymi wynikami badań i odzwierciedlają postawione cele badawcze. Wykaz piśmiennictwa obejmuje 197 pozycji, starannie dobranych tematycznie i aktualnych, w większości z ostatnich 10 lat.

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgra Miłosza Jakuba Regulskiego stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego nie tylko o dużej wartości poznawczej ale również aplikacyjnej. Warto podkreślić biegłość Doktoranta w posługiwaniu się bardzo specjalistyczną aparaturą badawczą, doskonale przygotowanie warsztatowe oraz umiejętność przeprowadzenia logicznej i zwięzłej dyskusji, co jest cechą dojrzałości naukowej. Ocena taka znajduje również potwierdzenie w umiejętności Doktoranta precyzyjnego, opartego na faktach wnioskowania.

Biorąc powyższe pod uwagę, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska odpowiada wymogom stawianym przez art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65 poz. 595). Z tego względu przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgra Miłosza Jakuba Regulskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. zw. dr hab. n. med. Jarosław Dudka