

2015 11. 16

**Prof. dr hab. Maria Koziółkiewicz**

Instytut Biochemii Technicznej

Politechnika Łódzka

ul. Stefanowskiego 4/10

90-924 Łódź

[maria.koziolkiewicz@p.lodz.pl](mailto:maria.koziolkiewicz@p.lodz.pl)

[markoz1@autograf.pl](mailto:markoz1@autograf.pl)

Łódź, 10 listopada 2015

Ocena osiągnięcia naukowego i całokształtu dorobku naukowego,  
dydaktycznego i organizacyjnego

**dr Ewy Augustin**

w związku z postępowaniem wszczętym na

Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego

o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego

w dziedzinie nauk biologicznych (dyscyplina: biologia)

Recenzję przedstawiam na wniosek **Dziekana Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego** realizującego postanowienie **Centralnej Komisji do Spraw Stopni i Tytułów** z dnia 5.10.2015r. Recenzję przygotowałam w oparciu o zestaw dokumentów przesłany na moje ręce w dniu 15 października b.r. Zbiór dokumentów zawiera autoreferat, dokument zatytułowany „wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki”, kopie publikacji stanowiących główne osiągnięcie naukowe oraz oświadczenia współautorów tych publikacji dotyczące ich udziału w badaniach i przygotowywaniu manuskryptów.

#### **Dane osobowe**

Dr Ewa Augustin jest absolwentką Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Gdańskiego. Studia na kierunku *Biologia* ukończyła w roku 1986 przedstawiając pracę magisterską pt. „Polimorfizm esteraz kilku krajowych populacji *Cyprinotus (Heterocypris incongruens)*” wykonaną pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Sywuli. W tym samym roku mgr Ewa Augustin rozpoczęła pracę w Katedrze Technologii Leków i Biochemii na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, gdzie była zatrudniona, kolejno, na etacie inżynierijno-technicznym (1986-1998), na stanowisku asystenta (1999-2000), adiunkta (2000-2011) oraz starszego wykładowcy (od 2011 – do chwili obecnej). Dr Ewa Augustin pracowała i pracuje w

Zespole Chemii i Biochemii Związków Przeciwnowotworowych kierowanym przez prof. Jerzego Konopę.

### **Ocena monotematycznego osiągnięcia naukowego**

Jako osiągnięcie naukowe dr Ewa Augustin przedstawiła cykl publikacji pod tytułem „Efekty biologiczne i biochemiczne indukowane przez przeciwnowotworowe pochodne akrydyny w komórkach nowotworowych”. Cykl ten obejmuje siedem publikacji, z czego sześć to prace oryginalne, opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych. Spośród tych sześciu artykułów jeden został opublikowany w 2006 roku, natomiast pozostałych pięć w latach 2013-2015. Wszystkie artykuły wchodzące w skład osiągnięcia naukowego są pracami wieloautorskimi (3-7 autorów) ale w pięciu pracach dr Ewa Augustin jest pierwszym i jednocześnie korespondencyjnym autorem. W dwóch artykułach jest drugim autorem, przy czym w pracy z 1998 roku w *Drugs of the Future* (IF=0,253) jako drugi autor jest jednocześnie wskazana jako autor do korespondencji. Publikacja ta, określona w autoreferacie jako monografia, zawiera charakterystykę imidazoakrydyny C-1311: opis syntezy, aktywności biologicznej i farmakokinetyki. Biorąc pod uwagę datę opublikowania i fakt, że przez wiele następnych lat związek ten był przedmiotem pogłębionych badań, charakterystyka ta jest tylko częściowa. Nie znam powodu, dla którego ta 5-stronnicowa praca została określona w autoreferacie jako monografia. Jeśli chodziło o załączenie publikacji o charakterze przeglądowym, to moim zdaniem powinna to być nowsza praca uwzględniająca wiele nowych obserwacji dotyczących omawianej grupy związków.

Sumaryczna wartość współczynnika IF dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi 16,75. Dwie spośród sześciu publikacji zostały opublikowane w *Biochemical Pharmacology* (IF=3,58), dwie w *Cell Biology International* (IF=1,63) i dwie w *Acta Pharmacologica Sinica* (IF=2,50). Wkład Kandydatki w realizację tych prac wynosi dla 4 publikacji po 60%, dla jednej - 30% i dla jednej - 75%. Udział w artykule w *Drugs of the Future* – 20%. Zgodnie z wymaganiami formalnymi Pani dr Ewa Augustin przedłożyła oświadczenia wszystkich współautorów o ich wkładzie w realizację poszczególnych prac.

Cykl publikacji wchodzących w skład monotematycznego osiągnięcia naukowego dotyczy ważnego zagadnienia jakim są mechanizmy działania akrydyn i ich pochodnych. Akrydyny to grupa związków chemicznych syntetyzowanych i badanych pod względem ich aktywności przeciwnowotworowej od wielu lat. Z racji ich zdolności do wiązania się z DNA

działają jako inhibitory replikacji, inhibitory topoizomeraz oraz telomeraz. Jednak ze względu na szereg efektów ubocznych, pochodne akrydyn nie zostały do tej pory zatwierdzone jako leki przeciwnowotworowe, a jeśli nawet tak się stało, to były szybko wycofywane (np. Ledacrin). Niemniej jednak, ich wysoka cytotoksyczność wobec modelowych komórek nowotworowych sprawia, że zainteresowanie tą grupą związków nie maleje: chemicy pracują nad syntezą nowych pochodnych, a biolodzy i farmakolodzy badają w coraz większym zakresie ich właściwości biologiczne licząc na zidentyfikowanie związku o wysokiej cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych ale jednocześnie pozbawionego wad akrydyn „starszej generacji”. Warto w tym miejscu przypomnieć, że badania nad taksolem trwały blisko trzydzieści lat, nim związek ten został zatwierdzony po raz pierwszy przez FDA jako lek przeciw rakowi jajnika (1992).

Publikacje dr Ewy Augustin wchodzące w skład Jej monotematycznego osiągnięcia dotyczą efektów komórkowych (apoptoza, nekroza, katastrofa mitotyczna i in.) oraz molekularnych (działanie enzymów fazy II, metabolity akrydyn, hamowanie aktywności kinazy białkowej FLT3) wywoływanych przez pochodne akrydyny o działaniu przeciwnowotworowym.

Pierwsza oryginalna publikacja wchodząca w skład osiągnięcia naukowego ukazała się w 2006 r. w *Biochemical Pharmacology* i dotyczy analizy cyklu życiowego komórek białaczkowych MOLT4 i HL60 oraz indukcji apoptozy przez triazoloakrydynę C-1305. Dwie kolejne prace, które ukazały się po kilkuletniej przerwie w 2013r. (*Acta Pharmacologica Sinica* i *Cell Biology International*), dotyczą nowych aspektów działania akrydyn, mianowicie roli cytochromów P450 (izoformy CYP3A4) oraz reduktazy cytochromu w generowaniu cytotoksyczności tych związków lub ich metabolitów. Obiektem badań były komórki jajnika chomika chińskiego CHO z nadekspresją genu reduktazy oraz komórki z nadekspresją reduktazy i izoformy CYP3A4 pochodzące z Biomedical Research Centre w Dundee.

Kolejna praca opublikowana w 2014 r. ponownie w *Cell Biology International* także dotyczy roli cytochromu CYP3A4. Stosując komórki HepG2 transfekowane genem CYP3A4 wykazano, że enzym ten nie tylko metabolizuje niektóre pochodne akrydyny (C-1748, ale nie C-1305) ale prawdopodobnie działa także na innej drodze. W dyskusji zasugerowano, że pochodna triazoloakrydonu C-1305 działa jako agonista jądrowego receptora PXR, który ma wpływ na ekspresję cytochromu CYP3A4 i prawdopodobnie innych enzymów fazy II. Wątek ten wydaje się bardzo interesujący. Został on rozwinięty w innej pracy pochodzącej z Katedry

Technologii Leków i Biochemii chociaż już bez udziału dr Ewy Augustin (*Biochemical Pharmacology*, 2013, Niemira, Dastyk i Mazerska: Pregnane X receptor dependent up-regulation of CYP2C9 and CYP3A4 in tumor cells by antitumor acridine agents, C-1748 and C-1305, selectively diminished under hypoxia).

Kolejne dwie prace opublikowane w bieżącym roku w *Biochemical Pharmacology* oraz *Acta Pharmacologica Sinica* dotyczą roli pochodnych C-1311 i C-1305 jako inhibitorów kinazy białkowej FLT3. Białko to należy do błonowych receptorów o aktywności enzymatycznej i w wyniku aktywacji staje się aktywną kinazą tyrozynową inicjującą wiele szlaków sygnałowych. Mutacje genu FLT3 prowadzą do konstytutywnej aktywacji kinazy i niekontrolowanej proliferacji komórek. Mutacje w genie kodującym to białko stwierdzono u ok. 30% pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML). Poszukując inhibitorów tego enzymu przetestowano wiele związków chemicznych, ale komórki białaczkowe nabywają z czasem oporność na te związki. Biorąc pod uwagę te fakty oraz wcześniejszą wzmiankę o hamowaniu kinazy FLT3 przez pochodną C-1311, dr Ewa Augustin powróciła do komórek białaczkowych (MV-4-11 i MOLM13 z konstytutywnie aktywną formą FLT3 oraz komórki RS-4-11 i HL60 z prawidłową formą kinazy) aby zbadać szczegółowo zdolności inhibitorowe pochodnej C-1311 wobec kinazy FLT3. Imidazoakrydon C-1311 okazał się efektywnym inhibitorem FLT3, znacznie lepszym niż triazoloakrydon C-1305, co może stanowić wstęp do dalszych pogłębionych badań. W bazie PubMed zarejestrowano dotychczas trzy publikacje na temat hamowania FLT3 przez pochodne akrydyny, współautorką dwóch z nich jest dr Augustin.

Podsumowując: w badaniach nad aktywnością biologiczną pochodnych akrydyn dr Ewa Augustin porównywała rodzaje śmierci komórkowej inicjowane przez te związki. Obok cytometrii przepływowej zastosowano wiele innych metod analitycznych dla potwierdzenia sposobu działania badanych związków. Wyniki te są niewątpliwie interesujące ale szczególną uwagę zwracają wyniki dotyczące hamowania kinazy FLT3 przez związek C-1311. Interesujące są także obserwacje dotyczące metabolizmu pochodnych C-1748 i C-1305 przez CYP3A4 oraz sugestie na temat roli C-1305 jako cząsteczki sygnałowej dla receptora PXR.

Pojawia się pytanie, w jakim stopniu oryginalna była hipoteza postawiona kilka lat temu przez dr Augustin, że pochodne akrydyn mogą być inhibitorami kinazy FLT3. W trakcie analizy tekstów publikacji, m.in. tekstu publikacji pt. "Modulation of CYP3A4 activity and induction of apoptosis..."; 2013; Cell Biology International znalazłam w *Introduction* następujący fragment (str. 109): *C-1311 is a protein (tak!) that inhibited the action of both*

*topoisomerases I and II as well as receptor tyrosine kinase FLT3 (Thomas et al., 2008).* Podając ten odnośnik, autorzy pracy sugerują, że już w 2008 roku znany był efekt inhibitorowy C-1311 wobec kinazy FLT3.

Według spisu publikacji (str. 120) jest to następujący komunikat: Thomas AL, Antony A, Scott E, Ahmed S, Lundberg AS, Major A, Capizzi RL, Twelves CJ (2008) C-1311 a novel inhibitor of FLT3 and topoisomerase II: a phase I trial of once every three week schedule in patients with advanced solid tumours. *J. Clin Oncol* 26: 2576. We wspomnianej wyżej pracy Anny Skwarskiej, Ewy Augustin i innych z 2015 roku podano inny odnośnik do najwcześniejszej wzmianki o hamowaniu FLT3 przez C-1311 w układzie bezkomórkowym: M. Chau, Y. Otake, JL. Christensen, DJ. Fernandes, AM. Ajami: The imidazoacridinone, C-1311 (Symadex): the first of a potent new class of FLT3 inhibitors. In AACR Meeting Abstracts, 2006, p. B35.

Chciałabym przedyskutować w rozmowie z Habilitantką kwestie dotyczące wstępnych obserwacji na temat hamowania kinazy FLT3 przez pochodną C-1311: kto, kiedy i w jakim zakresie badał ten efekt? Interesuje mnie także czy i w jakim stopniu planowane są badania dotyczące pochodnych akrydyn jako ligandów receptora PXR. Ostatnio przeprowadzono badania nad aktywacją tego receptora przez znane leki przeciwnowotworowe, ale nie było wśród nich pochodnych akrydyn. Aktywacja receptora PXR wydaje się istotna ponieważ jest on zaangażowany w etiologię stanów zapalnych. Może pochodne akrydyny, które są jego agonistami mają potencjał nie tylko przeciwnowotworowy? Niestety, autoreferat nie zawiera informacji o planach Habilitantki na przyszłość. Które z realizowanych dotychczas badań zamierza kontynuować? W związku z tym pytaniami zwracam się z prośbą do Przewodniczącego Komisji Habilitacyjnej o rozważenie celowości przeprowadzenia z Habilitantką rozmowy o Jej osiągnięciach i dalszych planach naukowych.

### **Ocena aktywności naukowej**

Zainteresowania naukowe dr Ewy Augustin dotyczą mechanizmów przeciwnowotworowego działania pochodnych akrydyn zsyntetyzowanych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii, w tym pochodnej C-1311 (imidzoakrydon, Symadex), pochodnej C-1305 (triazoloakrydon) i pochodnej C-1748 (4-metylo-1-nitroakrydyna). Tematem obronionej w 1998 roku pracy doktorskiej był „Wpływ związków biologicznie czynnych na cykl życiowy oraz programowaną śmierć (apoptozę) komórek nowotworowych”. Promotorem tej pracy był prof. Jerzy Konopa.

Po obronie pracy doktorskiej dr Ewa Augustin kontynuowała w ramach kilku kolejnych grantów badania dotyczące komórkowych efektów działania pochodnych akrydyny (triazoloakrydyny oraz acyloksytriazoloakrydyny). Przedmiotem zainteresowania zespołu realizującego te badania były różne rodzaje śmierci komórkowej indukowane przez pochodne akrydyn. Istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność działania związku chemicznego rozważanego jako lek przeciwnowotworowy są jego przemiany metaboliczne, a to z kolei zależy od ekspresji i aktywności enzymów fazy I i II, tzn. enzymów odpowiedzialnych za aktywację albo detoksykację ksenobiotyków, w tym leków. Głównymi enzymami zaangażowanymi w metabolizm leków są cytochromy P450, a jedną z izoform odpowiedzialnych za metabolizm terapeutyków jest izoforma CYP3A4. Komórki CHO z nadekspresją cytochromu CYP3A4 oraz reduktazy cytochromu P450 posłużyły do określenia cytotoksyczności i rodzaju odpowiedzi komórkowej indukowanej przez triazoloakrydon C-1305. Podobne badania w odniesieniu do imidazoakrydonu C-1311 oraz triazoloakrydonu C-1305 a także pochodnej C-1748 Kandydatka przeprowadziła wykorzystując komórki wątrobiaka HepG2 z konstytutywną ekspresją izoenzymu CYP3A4. Kolejny etap badań obejmował analizę zdolności pochodnych akrydyn C-1311 oraz C-1305 do hamowania receptorowej kinazy tyrozynowej FLT3 w komórkach ludzkich białaczek szpikowych AML.

W ostatnim okresie w ramach współpracy z kilkoma ośrodkami krajowymi i zagranicznymi (University of Virginia, Uniwersytet Warszawski, dwie katedry na macierzystym Wydziale) dr Ewa Augustin badała cytotoksyczne właściwości wybranych biomateriałów, kompleksów miedzi z pochodnymi imidazoli, nanomateriałów skoniugowanych z doxorubicyną. Efektem tych badań jest kilka dobrych publikacji (m.in. w *Biochemical Pharmacology*, *Biomacromolecules*, *Polyhedron*, *Carbohydrate Polymers*).

Dr Ewa Augustin jest autorką lub współautorką 20 publikacji opublikowanych w czasopiśmie znajdujących się w bazie JRC, jednego zgłoszenia patentowego (zakres terytorialny: Polska, Niemcy), jednej publikacji w czasopiśmie bez IF oraz jednego skryptu dla studentów. Sumaryczna wartość współczynnika IF wynosi 58,95, liczba cytowań: 168 (bez autocytowań: 145), indeks Hirscha: 7.

Kandydatka była kierownikiem trzech projektów badawczych, była lub jest obecnie głównym wykonawcą lub wykonawcą 6 grantów (łącznie: dziewięciu, z czego trzy finansowane przez KBN, dwa przez MNiSzW, jeden finansowany przez Fundację na Rzecz

Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny, jeden finansowany przez firmę Xanthus Life Science (USA) i dwa finansowane przez NCN oraz NCBiR).

### **Ocena dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego oraz współpracy międzynarodowej**

Dr Ewa Augustin od 1999 roku prowadzi regularną działalność dydaktyczną, która obejmuje wykłady, seminaria ćwiczenia oraz laboratoria. Wykład i laboratoria nt. „Kultury tkankowe oraz wykład obieralny nt. „Biologia komórki nowotworowej” habilitantka prowadzi według własnego programu. W ciągu 15 lat 51 dyplomantów przygotowało pod jej opieką prace dyplomowe ( z tego 32 – pracę magisterską). Jest to aktywność typowa dla nauczyciela akademickiego o dużej wiedzy i doświadczeniu, jakim jest niewątpliwie dr Ewa Augustin. W ramach projektu PO KL pt. „Zamawianie kształcenia na kierunkach technicznych, atematycznych i przyrodniczych Habilitantka koordynowała prace nad przygotowaniem skryptu pt. „Wybrane aspekty hodowli komórek roślinnych i zwierzęcych”. Uczestniczyła także w opracowaniu nowego programu studiów na kierunku *Biotechnologia*.

Liczne recenzje manuskryptów dokonywane głównie dla czasopisma *Biochemical Pharmacology* (21) oraz *Cell Biology International* (4) świadczą o rozpoznawalności dr Ewy Augustin w środowisku międzynarodowym.

### **Wniosek końcowy**

W mojej opinii monotematyczne osiągnięcia naukowe oraz inne dokonania dr Ewy Augustin świadczą o Jej znaczącym wkładzie w rozwój badań nad przeciwnowotworowymi właściwościami pochodnych akrydyn i innych związków chemicznych. Niezależnie od badań nad pochodnymi akrydyn, dr Ewa Augustin zaangażowała się w ostatnich kilku latach w realizację innych projektów badawczych, często w ramach współpracy z innymi jednostkami naukowymi. Dorobek publikacyjny dr Ewy Augustin (poza pracami wchodzącymi w skład osiągnięcia naukowego) spełnia kryteria dotyczące aktywności naukowej a określone w art. 16 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. N65, poz. 595, z późniejszymi zmianami). Pozytywnie oceniam także Jej dorobek dydaktyczny i organizacyjny. Uważam, że dorobek naukowy dr Ewy Augustin uzasadnia nadanie Jej stopnia doktora habilitowanego nauk biologicznych w zakresie biologii.

M. Kociński