



UNIwersYTET
IM. ADAMA MICKIEWICZA
W POZNANIU

prof. dr hab. Adam Huczyński
Zakład Chemii Medycznej, Wydział Chemii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań

Poznań, 12 sierpnia 2025 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej

"Badanie mechanizmów aktywności cytotoksycznej pochodnych tiomocznika"

autorstwa mgr Pauliny Strzyga-Łach

Oceny rozprawy doktorskiej pt. *"Badanie mechanizmów aktywności cytotoksycznej pochodnych tiomocznika"* dokonuję w związku z powołaniem mnie na funkcję recenzenta uchwałą Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM z dn. 18.06.2025.

Oceniana rozprawa doktorska stanowi zbiór **trzech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych**, które ukazały się w cenionych czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Pharmaceuticals*, *European Journal of Pharmacology* oraz *Archiv der Pharmazie*, opublikowanych w latach 2021–2024. Praca doktorska powstała w Katedrze i Zakładzie Biochemii, pod opieką dwóch promoterek: dr hab. n. farm. Anny Bielenicy (promotor) oraz dr hab. n. med. Alicji Chrzanowskiej (promotor pomocniczy).

Aby mieć formalny ogląd na te publikacje oraz udział Doktorantki w ich powstaniu, należy podkreślić, że we wszystkich trzech pracach **jest ona pierwszym autorem**, a w drugiej z nich **pełniła ponadto rolę autora korespondującego**. Według oświadczeń Autorki jej wkład w powstanie tych prac był znaczący i wynosił szacunkowo od 60 do 65%. Szacunki te znajdują potwierdzenie w oświadczeniach pozostałych autorów dotyczących ich własnego udziału w przygotowaniu publikacji.

W ramach prowadzonych badań Doktorantka była odpowiedzialna m.in. za przeprowadzanie pomiarów *in vitro* na nowotworowych liniach komórkowych, takich jak: pierwotny i przerzutowy rak jelita grubego (SW480 i SW620), rak prostaty (PC3) oraz białaczka (K-562). Zajmowała się także określaniem i badaniem kluczowych mechanizmów aktywności biologicznej, w tym analizą apoptozy i wydzielania IL-6 (związanej z progresją nowotworu), aktywacją kaspazy 3/7, hamowaniem szlaku NF- κ B oraz badaniem cyklu komórkowego.

Wszystkie te eksperymenty miały na celu, obok charakterystyki jakościowej, określenie możliwych (choć nie wszystkich) mechanizmów odpowiedzi komórkowej na pochodne tiomocznikowe. Związki wykorzystane w badaniach komórkowych mgr Paulina Strzyga-Łach otrzymała od swojej promotorki, która je syntetyzowała bądź nadzorowała ich syntezę przez innych chemików.

Zanim przejdę do formalnej analizy rozprawy doktorskiej oraz publikacji, które były już ocenione przez niezależnych recenzentów powołanych przez redaktorów naukowych czasopism, pragnę uzupełnić opis dorobku naukowego Doktorantki. Poza trzema wspomnianymi publikacjami jest ona współautorką dziewięciu innych artykułów naukowych oraz dwóch komunikatów posterowych zaprezentowanych na *Konwersatoriach Chemii Medycznej* w Lublinie. Badania prowadziła z dofinansowaniem w ramach *projektu Młodego Badacza WUM*, którego była kierownikiem. Jej działalność publikacyjna została wyróżniona zespołową nagrodą Rektora WUM w 2022 roku.

Oceniana praca doktorska, przedstawiona jako trzy wspomniane publikacje wraz z opisem ich treści, składa się z kilku części formalnych i merytorycznych. Najpierw przedstawiono wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy, a także publikacje naukowe spoza niej. Następnie uwzględniono informacje o udziale w konferencjach, zrealizowanych projektach badawczych oraz nagrodach i wyróżnieniach autora. Kolejna część to wykaz skrótów, po którym umieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim. Część właściwa rozprawy rozpoczyna się od wstępu, a następnie przechodzi do omówienia założeń i celu pracy, które stanowią wprowadzenie do trzech publikacji.

Chemioterapia jest obecnie najczęściej stosowaną metodą leczenia nowotworów, jednak jej poważnym ograniczeniem jest toksyczność wobec zdrowych komórek. Dlatego jednym z głównych wyzwań stojących przed współczesną nauką, a zwłaszcza chemią medyczną, jest opracowanie związków o wysokiej skuteczności i selektywności, a niskiej toksyczności. Obiecującą strategią jest łączenie w jednej cząsteczce dwóch aktywnych farmakoforów. Tiomoczniki, znane z działania przeciwnowotworowego, np. w leku *sorafenib* wprowadzonym przez firmę Bayer pod nazwą *Nexavar* do leczenia zaawansowanego raka nerki i raka wątrobowokomórkowego oraz właściwości przeciwbakteryjnych, przeciwwirusowych, przeciwzapalnych, antyoksydacyjnych i oddziałujących na ośrodkowy układ nerwowy. Stanowią one zatem wartościowy punkt wyjścia do pogłębionych badań ich działania na układy komórkowe.

W niniejszej rozprawie doktorskiej skoncentrowano się na 1,3-dwupodstawionych pochodnych tiomocznika, zaprojektowanych i zsyntetyzowanych w *Katedrze i Zakładzie Biochemii WUM*. Autorzy omawianych badań otrzymali różnorodne tiomoczniki zawierające silnie elektroujemne podstawniki (CF_3 , NO_2 , halogeny) w pierścieniach fenyłowych. Wybór tej grupy związków jako obiektu badań biologicznych został we wstępie rozprawy, jak i we wstępie do każdej z publikacji właściwie i wyczerpująco uzasadniony, a synteza obiektów badań, która nie była obiektem pracy Doktorantki, jest stosunkowo prosta i wydajna.

Oceniając rozprawę doktorską typu „zszywka”, jako recenzent zawsze mam dylemat: czy najpierw przeczytać opis zawartości publikacji, a następnie, weryfikując go, zapoznać się z samymi artykułami, czy też najpierw przeczytać publikacje, ocenić je, a dopiero potem sprawdzić, co dokładnie wykonywała Doktorantka i jak opisała swoje badania. W tym przypadku wybrałem drugą metodę i w ten sam sposób przedstawię swoje spostrzeżenia.

W pierwszej publikacji (*Pharmaceuticals* 2021, 14, 1097) opisano badania serii nowych analogów 3-(trifluorometyl)fenylo tiomocznika oraz oceniono ich cytotoksyczność *in vitro* wobec panelu linii komórkowych. Niektóre z otrzymanych związków wykazywały wysoką aktywność wobec komórek nowotworowych ($\text{IC}_{50} \leq 10 \mu\text{M}$). Doktorantka zajmowała się oceną właściwości przeciwproliferacyjnych wobec ludzkich komórek raka jelita grubego (SW480, SW620), raka prostaty (PC3) oraz białaczki (K-562), a także prawidłowych komórek HaCaT (zdrowych, unieśmiertnionych keratynocytów), wykorzystując standardowy test MTT. Uzyskane wyniki weryfikowała dodatkowo testem żywotności z użyciem błękitu trypanu (TB). Ponadto, stosując cytometrię przepływową, oceniła zdolność badanych związków do indukcji wczesnej i późnej apoptozy lub nekrozy w testowanych liniach komórkowych. Przeprowadziła także oznaczenia poziomu interleukiny-6, wykazując, że niektóre tiomoczniki charakteryzują się silnym działaniem proapoptotycznym, a wszystkie badane pochodne wykazują aktywność przeciwko IL-6, istotnie obniżając poziom tej prozapalnej cytokiny wydzielanej przez komórki raka jelita grubego. Przeprowadzone badania zostały przedstawione przy pomocy czytelnych tabel i wykresów.

W publikacji drugiej (*European Journal of Pharmacology* 982 (2024) 176885) badano jedynie dwa niesymetryczne tiomoczniki: 1-(3,4-dichlorofenyl)-3-[3-(trifluorometyl)fenyl]tiomocznik oraz 1-[3-(trifluorometyl)fenyl]-3-[4-(trifluorometyl)fenyl]tiomocznik. Doktorantka prowadziła badania *in vitro* na tym samym zestawie linii komórkowych, co w publikacji pierwszej. Pogłębione analizy, przeprowadzone przez mgr

Paulinę Strzygę-Łach, pozwoliły określić wpływ tych dwóch tiomoczników na kluczowe szlaki biochemiczne związane z rozwojem nowotworu, takie jak aktywacja kaspaz 3/7, zmniejszenie aktywacji NF- κ B (jądrowego czynnika transkrypcyjnego), ograniczenie wydzielania VEGF (wzrostowego czynnika śródbłonka naczyniowego) oraz produkcję ROS (reaktywnych form tlenu).

Dodatkowo, jak wynika z treści doktoratu, we współpracy z dr Andrzejem Ciechanowiczem z Zakładu Medycyny Regeneracyjnej WUM, działającego w ramach Centrum Badań Przedklinicznych CEPT WUM, przeprowadzono analizę metabolomiczną, która pozwoliła określić zmiany w profilu metabolitów, które zaistniały w komórkach po potraktowaniu ich tiomocznikami.

Ponieważ w oświadczeniach współautorów nie znalazłem potwierdzenia formy udziału dr Andrzeja Ciechanowicza w tych badaniach, i nie jest on współautorem publikacji, proszę podczas obrony doktoratu o jednoznaczne określenie roli Doktorantki w tych badaniach. Czy polegała ona na realizacji wspólnych badań, czy raczej na zleceniu wybranych fragmentów tych badań. Proszę o wyjaśnienie tego dla jasności sytuacji, gdyż opis współpracy w rozprawie doktorskiej jest moim zdaniem niejednoznaczny.

W ramach kolejnej współpracy z dr. Jarosławem Szczepaniakiem z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW oceniano również żywotność komórek nowotworowych w hodowlach sferoidów (3D), które lepiej odwzorowują dostęp substancji odżywczych do komórek oraz uwzględniają interakcje międzykomórkowe. Podsumowując wkład pani mgr Pauliny Strzygi-Łach, jej badania z udziałem tiomoczników jednoznacznie wykazały proapoptotyczne działanie obu związków, aktywowanie przez nie kaspaz 3/7, obniżanie aktywności NF- κ B oraz hamowanie procesu angiogenezy, a uzupełnione o badania współautorów pokazały niezwykle potencjał tkwiący w tych wybranych pochodnych tiomocznika.

W publikacji trzeciej (*Arch. Pharm.* 2023; e2300105) Doktorantka przeprowadziła badania aktywności biologicznej serii 16 nowych pochodnych difenylotiomocznika, zsyntetyzowanych przez jej promotorkę, dr hab. n. farm. Annę Bielenicę. Warsztat badawczy był zbliżony do tego zastosowanego we wcześniejszych pracach. Większość tiomoczników wykazywała większą skuteczność wobec komórek nowotworowych niż cisplatyna, przy jednoczesnym zachowaniu korzystnej selektywności. Mechanizmy przeciwnowotworowego działania badano za pomocą standardowych testów, wykazując, że wybrane związki indukują

późną apoptozę lub nekrozę, czemu towarzyszył wzrost aktywacji kaspaz 3 i 7, hamowanie wydzielania cytokiny IL-6 oraz zwiększona produkcja ROS. Co ciekawe, analiza cyklu komórkowego ujawniła, że niektóre pochodne działały w fazie sub-G1 i/lub G0/G1, a inne w fazie G2.

Nie znalazłem satysfakcjonującego wyjaśnienia tego zjawiska, dlatego proszę o przedstawienie podczas obrony ewentualnej hipotezy.

W swojej rozprawie doktorskiej oraz w publikacji mgr Paulina Strzyga-Łach przeprowadziła również analizę liofilowości otrzymanych tiomoczników, zapominając jednak, że w chemioterapii droga doustna jest raczej rzadkością niż regułą, oraz pomijając inne ważne czynniki wynikające z „reguły 5” Lipinskiego. Zgodnie z nią, większość „lekopodobnych” cząsteczek podawanych doustnie powinna mieć $\log P \leq 5$, masę cząsteczkową ≤ 500 , liczbę akceptorów wiązań wodorowych ≤ 10 oraz liczbę donorów wiązań wodorowych ≤ 5 . Dodatkowo wykazano, że całkowita polarna powierzchnia (tPSA) < 140 oraz liczba rotujących wiązań < 10 , w połączeniu z $\log P < 5$, są kluczowe zarówno dla dobrej biodostępności, jak i przepuszczalności przez błony biologiczne. Tych parametrów nie przedyskutowano w publikacji, jednak jest to uwaga raczej do chemików medycznych, którzy są współautorami tej pracy. Liofilowość to nie wszystko. Owszem wpływa na wchłanianie leków, biodostępność, hydrofobowe interakcje lek-receptor, metabolizm cząsteczek, a także ich toksyczność, ale warto powiązać ją z innymi danymi, które można łatwo wygenerować znając strukturę związku.

Jeżeli chodzi o opis treści publikacji zawarty w rozprawie doktorskiej, wnioski z nich płynące oraz opis wykonanych badań biologicznych i biochemicznych przeprowadzonych przez Doktorantkę, a także powiązanie ich ze znaczeniem dla badań na komórkach nowotworowych, to zostały one przedstawione językiem naukowym, rzetelnie, bez przekłamań i niezwykle czytelnie. Uzyskane Przez Doktorantkę dane pozwoliły na analizę zależności między strukturą a cytotoksycznością (SAR) badanych tiomoczników oraz na przedstawienie mechanizmów działania tych związków. Z publikacji i doktoratu możemy dowiedzieć się jak związki te działają na komórki i szlaki sygnałowe oraz metabolizm komórek, nie wiemy jednak nadal nic o tym co jest celem ich działania, jaka jest molekularna podstawa działania, nie wiemy nawet czy jest to działanie „jeden związek - jeden cel biologiczny”. Badania Doktorantki wykazały natomiast, że tiomoczniki w komórkach nowotworowych uruchamiają kaskadę zdarzeń prowadzących do obserwowanych reakcji

komórek, indukując ich śmierć. Dzięki jej badaniom wiemy zatem o wiele więcej o właściwościach tiomoczników, choć nadal nie wiemy wszystkiego.

Po lekturze tych trzech publikacji i rzetelnie napisanego wstępu do nich oraz wniosków zawartych w doktoracie gotów jestem do przedstawienia końcowej konkluzji o tym, iż omawiane badania stanowią cenny i oryginalny wkład do współczesnej nauki.

Pozytywnie oceniam wykonaną pracę badawczą i stwierdzam jednoznacznie, że będąca przedmiotem niniejszej recenzji, rozprawa doktorska mgr Pauliny Strzygy-Łach spełnia wszystkie wymogi formalne i zwyczajowe oraz warunki określone w art.187 ust. 1-2 *Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20 lipca 2018 r. (tekst jedn. Dz.U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) stawiane pracom składanym przez osoby ubiegające się o stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne i wnoszę do *Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego* o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Pauliny Strzygy-Łach do dalszych etapów przewodu doktorskiego.