



**KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII
I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
UNIwersytet Medyczny w Lublinie**

20-093 Lublin, ul. dr W. Chodźki 1

tel. fax 48 (81) 742-37-93

Lublin, 18.10.2021

Ocena rozprawy doktorskiej mgr **Pauliny Strzyga-Łach** pt. „Ocena rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Strzyga-Łach pt. „Badanie mechanizmów aktywności cytotoksycznej pochodnych tiomocznika”

„

Choroby nowotworowe są wyzwaniem współczesnej medycyny. Mimo ogromnego postępu, w niektórych typach nowotworów leczenie nie przynosi oczekiwanych, dobrych rezultatów. Jedną z takich grup nowotworów są nowotwory raka jelita grubego, które mimo szeregu programów ich przesiewowego wykrywania, są rozpoznawane w dalszym ciągu z opóźnieniem, co znacząco ogranicza sukces leczenia i drastycznie skraca czas przeżycia chorych. Mimo stosowania różnych form chemioterapii, w tym ukierunkowanych na zmiany genetyczne, leczenie nie przynosi pożądanego efektu, między innymi ze względu na heterogenność nowotworu na poziomie morfologicznym, genetycznym i epigenetycznym. Dlatego podejmowane są próby poszukiwania nowych generacji chemioterapeutyków.

W ten nurt badań wpisuje się przedłożona do oceny rozprawa Pani **Pauliny Strzyga-Łach**. Stanowi ona raport z badań Autorki dotyczących potencjalnej roli pochodnych tiomocznika jako nowych leków przeciwnowotworowych.

Wyniki rozprawy doktorskiej w postaci trzech oryginalnych prac naukowych zostały opublikowane w latach 2021, 2023 i 2024 w uznanych czasopismach międzynarodowych (Pharmaceuticals; Eur. J. Pharmacol.; Arch. Pharm) z wysokim IF:

1. **Strzyga-Łach P**, Chrzanowska A, Podsadni K, Bielenica A. Investigation of the mechanisms of cytotoxic activity of 1,3-Disubstituted thiourea derivatives. Pharmaceuticals. 2021, 28; 14(11).

2. **Strzyga-Łach P**, Kurpios-Piec D, Chrzanowska A, Szczepaniak J, Bielenica A. 1,3- Disubstituted thiourea derivatives: Promising candidates for medicinal applications with enhanced cytotoxic effects on cancer cells. Eur J Pharmacol. 2024, 14;982:176885.
3. **Strzyga-Łach P**, Chrzanowska A, Kiernozek-Kalińska E, Żyżyńska-Granica B, Podsadni K, Podsadni P, Bielenica A. Proapoptotic effects of halogenated bisphenylthiourea derivatives in cancer cells. Arch Pharm. 2023, 356(9).

Całość osiągnęła imponujący jak na ten etap kariery naukowej IF równy 13,715. Doktorantka jest pierwszym Autorem wszystkich prac, co świadczy o jej znaczącym wkładzie w ich wykonanie i przygotowanie do publikacji. Wraz z rozprawą zostały przesłane wymagane oświadczenia, a wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie omawianych publikacji w pracy doktorskiej, określając w procentach swój w nich udział. Na uwagę zasługuje opis udziału pracy poszczególnych Autorów w publikacji, z którego wynika, że Doktorantka wykonała znaczącą część doświadczeń, brała też istotny udział w redakcji manuskryptów.

Rozprawa liczy 90 stron i została podzielona na 5 zasadniczych rozdziałów: **Wstęp**, **Założenia i Cel pracy**, **Kopie Opublikowanych Prac**, **Podsumowanie i Wnioski** oraz wspólne dla nich piśmiennictwo. Rozprawa zawiera również streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, została wzbogacona o wykaz używanych skrótów i symboli stanowiące użyteczny dla czytelnika odnośnik do tekstu. Brakuje mi chociaż krótkiego zestawienia metod badawczych, określanych zwykle jako „Metody”, jednoznacznie wyodrębnionych „Wyników” oraz „Wniosków” zamiast podrozdziału „**Podsumowanie i Wnioski**” oraz klasycznej „Dyskusji”. Co prawda, elementy te znalazły się oczywiście w pracach oryginalnych, jak również zostały zaprezentowane w omówieniu tych prac w języku polskim, tym niemniej moim zdaniem korzystna dla całościowego obrazu rozprawy byłaby zbiorcza synteza prac oryginalnych.

Do rozprawy dołączono natomiast listę prac opublikowanych przez Doktorantkę, ale nie wchodzących w jej skład, listę konferencji, projektów oraz nagród i wyróżnień. Gratulując Doktorantce tych osiągnięć, moim zdaniem nie powinny one jednak być częścią pracy doktorskiej (strona 7 i 8).

Wstęp zawarty na stronach 16-20 zaczyna się wprowadzeniem w zagadnienia terapii spersonalizowanej nowotworów. Następnie Autorka omawia potencjał pochodnych tiomocznika w kontekście terapii onkologicznej. Używa przy tym zbyt ogólnego określenia

po pochodnych tiomocznika jako „modyfikatorów białek”, które wywierają swoje działanie poprzez zmiany struktury białek. Nie podaje jednak konkretnych przykładów takiego działania i szczegółowych mechanizmów wewnątrzkomórkowych, które są za tego typu zmiany odpowiedzialne. Podobnie wspomniany jest wpływ pochodnych tiomocznika na indukcję apoptozy, czy zatrzymanie cyklu komórkowego – np. nie ma odniesienia, czy substancje te powodują zmiany w ekspresji cyklin czy może aktywności enzymatycznej kinaz cdk lub zmiany w ekspresji inhibitorów cyklu (białek p16, p21^{waf1})? Myślę, że byłoby to ciekawym uzupełnieniem **Wstępu**. Doktorantka koncentruje się za to bardziej na modyfikacjach cząsteczki tiomocznika i wpływie różnego typu podstawników na właściwości chemiczne, biodostępność, co z kolei powoduje różne efekty działania tych substancji w różnych nowotworach. Wspomina też o lekach onkologicznych zawierających w swoim składzie tiomocznik – inhibitorach kinaz tyrozynowych receptorów czynników wzrostu czy kinaz z klasy MAPK, jak również leków działających na poziomie epigenetycznym – poprzez wpływ na aktywność deacetylaz histonów z klasy Sirtuin.

Cele badawcze pracy sformułowane są krótko i przejrzysto - zbadanie i poznanie mechanizmów cytotoxyczności szeregu 1,3- dwupodstawionych pochodnych tiomocznika zsyntetyzowanych de novo w laboratoriach WUM oraz poznanie zależności struktura-aktywność tych analogów względem komórek nowotworowych. Autorka rozprawy posłużyła się kilkoma rodzajami linii komórkowych – raka jelita grubego (ognisko pierwotne – SW480 i przerzut od tego samego pacjenta – SW620), prostaty (PC3) i przewlekłej białaczki szpikowej (K-562) oraz, co bardzo istotne, kontrolną linią komórek keratynocytów określanych jako prawidłowe – HaCaT.

W metodyce badań Doktorantka posłużyła się standardowymi technikami hodowli komórkowych, testem cytotoxyczności MTT i barwieniem Trypan Blue, metodami cytometrii przepływowej, testami ELISA, czy analizami metabolicznymi – rozprawa spełnia więc wymogi nowoczesności wymagane w badaniach z tego zakresu. Analiza statystyczna nie budzi zastrzeżeń. Przyjęte testy statystyczne nie odbiegają od standardów światowych, a ich wybór należy uznać za odpowiedni.

Przechodząc do oceny wyników w pracach oryginalnych –artykuły ukazały się w prestiżowych czasopismach naukowych - Pharmaceuticals; Eur. J. Pharmacol.; Arch. Pharm. o wysokim współczynniku wpływu IF, co już samo z siebie świadczy o istotności podejmowanych w nich zagadnień i jakości przeprowadzonych badań.

Celem pracy oryginalnej opublikowanej w Pharmaceuticals było w pierwszym etapie zsyntetyzowanie szeregu pochodnych tiomocznika a następnie przeprowadzenie badań przesiewowych, aby scharakteryzować najbardziej obiecujące pochodne w aspekcie ich

cytotoksyczności przeciwnowotworowej. Należy podkreślić dużą liczbę testowanych substancji po wcześniejszym potwierdzeniu ich struktury chemicznej poprzez analizy NMR i HRMS. Na podstawie wyznaczonej wartości IC₅₀ najbardziej efektywne działanie przeciwnowotworowe względem wszystkich badanych linii posiadały dihalogenofenyłowe pochodne oraz *para*-podstawione pochodne tiomocznika, choć wykazywały one różną aktywność zależnie od rodzaju nowotworu. Zróznicowanie aktywności badanych substancji w linii SW480 pierwotnego raka jelita grubego w stosunku do linii z ogniska przerzutowego (SW620) od tego samego pacjenta sugeruje dużą heterogenność tego nowotworu, co sugeruje konieczność odmiennego podejścia terapeutycznego.

Jednocześnie Doktorantka zaobserwowała akceptowalny poziom cytotoksyczności względem komórek prawidłowych, co jest dobrym punktem wyjścia do dalszych badań tych pochodnych. Testy cytotoksyczności MTT potwierdzono inną metodą – barwieniem Trypan Blue, jednak w odniesieniu do komórek nowotworowych bardziej miarodajnym testem hamowania proliferacji byłby raczej test inkorporacji bromodezoksyurydyny (BRdU). Używając wytypowanych pochodnych tiomocznika w następnym etapie badań mgr Paulina Strzyga-Łach dokonała też analizy stopnia indukcji apoptozy w poszczególnych liniach komórek nowotworowych wykazując różną ich wrażliwość zależnie od typu nowotworu i badanej substancji.

Badania kontynuowała w drugiej publikacji cyklu (Eur. J. Pharm.) koncentrując się na wybranych pochodnych i mechanizmach prowadzących do śmierci komórki nowotworowej poprzez indukcję apoptozy, generację ROS oraz hamowanie aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFκB. W badaniach tych ograniczyła się do oceny aktywności kaspaz 3 i 7, czyli końcowych kaspaz efektorowych. Ciekawym byłoby też określenie aktywności kaspazy 8 (droga zewnątrzpochodna – poprzez receptory śmierci) i kaspazy 9 (droga wewnątrzpochodna apoptozy), aby bardziej precyzyjnie określić szlak wiodący do śmierci komórki. Podobnie, interesującym byłoby określenie, na którym etapie szlaku NFκB wywierane jest działanie poszczególnych pochodnych. Istotnym aspektem tej pracy było wykonanie badań metabolomicznych i bioinformatycznych, co może dać podstawy do następnych prac w tym zakresie. Na uwagę zasługuje też zastosowanie hodowli komórkowych 3D, które lepiej odzwierciedlają warunki rozrostu guza niż hodowle 2D.

W trzeciej pracy cyklu Autorka powróciła do badań przesiewowych, które obejmowały 16 nowych pochodnych difenylotiomocznika o różnorodnej strukturze zsyntetyzowanych w macierzystej jednostce. Widocznie potencjał przeciwnowotworowy badanych substancji w poprzednich publikacjach nie był dla Doktorantki do końca zadowalający. Opierając się na poprzednio stosowanej metodyce i tych samych liniach komórkowych wyselekcjonowała 7 związków o największym potencjale przeciwnowotworowym. W pracy tej skoncentrowała się na analizie zależności między uzyskanymi wynikami cytotoksyczności, a budową badanych

związków, wykazując zróżnicowane ich działanie w stosunku do poszczególnych linii komórkowych. Zwróciła uwagę na ich biodostępność wyrażającą się m.in. w lipofilności, potwierdzając przy tym dość wysoką selektywność w stosunku do komórek nowotworowych w porównaniu z kontrolnymi keratynocytami. Badania te, choć nie przesądzają o przydatności poszczególnych pochodnych tiomocznika w terapii onkologicznej, to stanowią dobry punkt wyjścia do dalszych analiz w tym zakresie.

Dyskusja przedstawionej do recenzji dysertacji jest zawarta w oryginalnych publikacjach w języku angielskim, jak również w opisie poszczególnych prac oryginalnych poprzez komentarz ich wyników. Świadczy to o swobodnym poruszaniu się Autorki w zagadnieniach będących przedmiotem rozprawy doktorskiej. Zawarte informacje w sposób rzeczowy i wiarygodny porównują uzyskanie wyniki z danymi zaczerpniętymi z piśmiennictwa.

Jako **Wnioski** należałoby chyba potraktować ostatnie zdania rozdziału **Podsumowanie i Wnioski**, - pozwoliłem sobie je przytoczyć poniżej, pozostałe są raczej ponownym streszczeniem **Wyników**.

„1.Przeprowadzone badania wykazały, że wybrane pochodne tiomocznika charakteryzują się silnym i selektywnym działaniem cytotoksycznym wobec różnych linii komórek nowotworowych, przewyższającym w niektórych przypadkach skuteczność referencyjnej cisplatyny. 2. Zidentyfikowano mechanizmy molekularne leżące u podstaw ich aktywności, obejmujące indukcję apoptozy, zahamowanie kluczowych szlaków proliferacyjnych i angiogenezy, a także modulację odpowiedzi zapalnej i metabolizmu komórkowego. 3.Szczególnie obiecujące okazały się pochodne dihalogenofenyłowe, które wykazały wielokierunkowe działanie przeciwnowotworowe oraz korzystny profil bezpieczeństwa. 4.Uzyskane wyniki stanowią solidną podstawę do dalszych badań nad rozwojem tych związków jako potencjalnych kandydatów do terapii nowotworowej.”

Piśmiennictwo zawierające 75 pozycji jest adekwatne i świadczy o umiejętności selekcjonowania istotnych informacji związanych z podjętym tematem badań. Umieszczone pozycje piśmiennictwa są aktualne i znajdują się w bazach danych czasopism naukowych. Zdecydowana większość pozycji pochodzi z ostatnich lat.

Konkludując stwierdzam, że przedmiot prowadzonych badań, dobór metod, prezentacja wyników, rzeczowość dyskusji oraz uzyskane wnioski odpowiadają kryteriom stawianym pracom doktorskim. **„Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668)”**

W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Strzygi – Łach do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem:

Andrzej Stepulak