



Warszawa, 19 maja 2025

Recenzja

Rozprawy doktorskiej lekarza Piotra Strusa pt: „Pochodne podofilotoksyny i benzotiazolu jako leki przeciwnowotworowe – optymalizacja struktury i badanie mechanizmu działania”:

Przedstawiona rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, promotorem rozprawy jest Pani dr hab. n. med. Izabela Młynarczyk-Biały.

Na rozprawę doktorską składają się cztery publikacje, w których Doktorant jest pierwszym autorem.

1 – Rozdział w monografii “ Advances in Biomedical Sciences” Wydawnictwo Naukowe TYGIEL „Novel podophyllotoxin derivatives as Anticancer Agents: Desing, Synthesis and Biological Screening

2 – Praca oryginalna - Toxicology *in Vitro* (Elsevier; IF=3.4) „Novel podophyllotoxin and benzothiazole derivative induces transitional morphological and functional changes in HaCat cells”

3 – Praca oryginalna - International Journal of Molecular Sciences (MDPI: IF=4.9) “Cellular Distribution and Ultrastructural Changes in HaCat Cells Induced by Podophyllotoxin and Its Novel Fluorescent Derivative, Supported by the Molecular Docking Studies”

4 – Publikacja przeglądowa - International Journal of Molecular Sciences (MDPI: IF=4.9) “The Effect of Podophyllotoxin Derivatives on Noncancerous Diseases: A systematic review”

Łączny Impact Factor w/w prac wynosi: 13.485, a suma punktów MNiSW: 380. W momencie składania pracy doktorskiej łączna liczba cytowań wynosiła 16.

Całkowity dorobek Doktoranta obejmuje: 5 publikacji w czasopismach indeksowanych o łącznym IF=16.875 i 520 punktach MNiSW, według dostępnych danych całkowita liczba cytowań na dzień 17.05.2025 roku wynosi 134

W dysertacji Doktorant przedstawił 4 wyżej wymienione publikacje anglojęzyczne w wersji oryginalnej, zostało to uzupełnione cztero stronicowym wstępem oraz sześć stronicowym podsumowaniem i wnioskami. Na dysertację składają się również: wykaz publikacji wraz z IF (Impact Factor), punktacją MNiSW oraz liczbą cytowań (potwierdzony przez Bibliotekę WUM), spis treści, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim oraz w języku angielskim, bibliografia. Doktorant zamieszcza również kopie oświadczeń wszystkich współautorów publikacji które wchodzi w skład dysertacji. Na ich podstawie wynika, że średni procentowy wkład w przygotowanie przedstawionych publikacji wynosi 36.25 %. Pomimo, że udział ten nie jest wysoki, współautorzy wskazują że Doktorant miał aktywny i potwierdzony merytoryczny udział w



powstawanie każdej z przedstawionych prac. Jego wkład obejmował m. in. przedstawienie pomysłu na pracę, wykonanie części eksperymentalnej wraz prowadzeniem hodowli komórkowej, analizę wyników, przygotowanie manuskryptu, a ponadto w pracy nr 3 Doktorant zapewniał również finansowanie projektu badawczego. Należy również podkreślić że Doktorant był kierownikiem dwóch projektów badawczych: Mini Grant studencki WUM; 2020-2021 („Projektowanie, tworzenie i analiza aktywności nowych pochodnych podofilotoksyny z benzotiazolem - jako substancji przeciwnowotworowych”) oraz Grant Młodego Badacza WUM; 2021-2022 („RNA sequencing in HaCat cells treated with a Podophyllotoxin and Benzothiazole Derivative”). Oba projekty umożliwiły Doktorantowi finansowanie prowadzonych badań.

Światowa Organizacja Zdrowia przewiduje, że do 2050 roku liczba nowych przypadków nowotworów może wzrosnąć do 35 milionów rocznie, co stanowi wzrost o 77% w porównaniu np. z 2022 rokiem. W związku z powyższym zapotrzebowanie na nowe coraz skuteczniejsze terapie jest priorytetowe. Interdyscyplinarne zespoły badawcze na całym świecie poszukują nowych bardziej skutecznych leków, które mogłyby być stosowane w terapii celowanej, i w związku z tym wykazywałyby niższą cytotoksyczność dla komórek zdrowych. Przedstawiona dysertacja lek. Piotra Strusa wpisuje się w ten trend. Doktorant wskazuje na potrzebę poszukiwania nowych związków o coraz lepszym potencjale terapeutycznym, które jednocześnie charakteryzowałyby się mniejszymi skutkami ubocznymi. Ponadto istotnym czynnikiem według Doktoranta powinna być tzw bezpieczna synteza i przystępna cena leku.

Ze względu na fakt, że wszystkie prace zawarte w dysertacji zostały poddane recenzji przez specjalistów, a 3 z nich są opublikowane w czasopismach o szerokim zasięgu międzynarodowym, w swojej recenzji skupię się przede wszystkim na najważniejszych osiągnięciach i przedstawionych przez Doktoranta wnioskach wynikających z przeprowadzonych badań.

W pierwszej kolejności chciałabym zwrócić uwagę na tytuł przedstawionej rozprawy doktorskiej który brzmi „Pochodne podofilotoksyny i benzotiazolu jako leki przeciwnowotworowe – optymalizacja struktury i badanie mechanizmu działania”. Moim zdaniem tytuł wskazuje, że Doktorant będzie badał mechanizmy działania nowych pochodnych w różnych komórkach nowotworowych i na podstawie uzyskanych wyników może wnioskować że mają one potencjał przeciwnowotworowy. Jednakże, po zapoznaniu się z przedstawionymi pracami eksperymentalnymi, uważam że Doktorant przede wszystkim skupił się na mechanizmie działania jednej z nowych pochodnych tj. KL3 w komórkach HaCat (komórki kontrolne) i komórkach obwodowych krwi (PBMC) w porównaniu ze związkiem bazowym tj podofilotoksyną (praca nr 2) oraz analizował dystrybucję wewnątrzkomórkową PPT i jej fluorescencyjnej pochodnej (PPT- FL) oraz ich wpływ na struktury w komórkach HaCaT, badania również obejmowały analizę dokowania molekularnego obu związków (praca nr 3). Przeciwnowotworowy potencjał analizowany był w pracy nr 1, jednakże zakres przedstawionych eksperymentów ograniczył się do analizy żywotności 6 linii komórek nowotworowych i ich struktury pod mikroskopem po ekspozycji na pochodną KL3. W związku z powyższym uważam że tytuł może być mylący i zwracam się więc z uprzejmą prośbą do Doktoranta o wyrażenie swojej opinii w stosunku do powyżej przedstawionej uwagi.



Chciałabym jednak podkreślić, że wyniki przedstawiające mechanizm działania pochodnej KL3 w komórkach nienowotworowych są bardzo wartościowe ze względu na fakt, że nie jest powszechnym badaniem dokładnego molekularnego mechanizmu działania związku o potencjalnym działaniu nowotworowym w komórkach kontrolnych. Ponadto fakt przeprowadzania unikatowej syntezy pochodnej fluorescencyjnej PPT (PPT-FL) o podobnym do bazowej PPT działaniu cytotoksycznym i powinowactwie do β tubuliny, może znaleźć zastosowanie w śledzeniu dystrybucji PPT w komórkach w badaniach farmakologicznych.

Jako główny Cel Projektu, Doktorant przyjmuje „opracowanie i przetestowanie nowych pochodnych PTT, które mają być bardziej skuteczne i mniej toksyczne dla ludzkich komórek niż macierzysta PPT”, następnie stawia dwa pytania badawcze w których mowa jest o trzech nowych pochodnych PPT w kontekście ich toksyczności i mechanizmie działania. Uważam, że tak jak w przypadku sformułowania tytułu rozprawy, Doktorant również położył nacisk na 3 nowe pochodne i ich przeciwnowotworowe działanie, natomiast tak jak wspomniałam powyżej, zasadniczą treścią dysertacji jest badanie mechanizmów działania pochodnej KL3 i pochodnej fluorescencyjnej PPT w komórkach nienowotworowych HaCat. Zwracam się zatem ponownie z uprzejmą prośbą do Doktoranta o odniesienie się do tej uwagi.

Podsumowując krótko najważniejsze wyniki i wnioski płynące z przedstawionego cyklu prac:

“Novel podophyllotoxin derivatives as Anticancer Agents: Desing, Synthesis and Biological Screening”

Jako związek bazowy wybrana została podofioltoksyna substancja pochodzenia naturalnego, wykazujące działanie terapeutyczne w tym przeciwnowotworowe, ale ze względu na liczne i poważne działania niepożądane jej stosowanie jest bardzo ograniczone.

- Opisano proces syntezy trzech nowych pochodnych PTT, **KL1** - pochodna z 1 arylonnaftalenem; **KL2**- pochodna z L-prolinolem; **KL3**- pochodna z benzotiazolem.
- Na podstawie przeprowadzonego testu przeżywalności z wykorzystaniem komórek nowotworowych: (HeLa- rak szyjki macicy; MDA i MCF7 -rak piersi, PC3 i DU145 - rak prostaty; CFPAC - rak trzustki) oraz komórek mysich fibroblastów NIH-3T3 (komórki kontrolne) wykazano że 3 pochodne charakteryzują się niższą cytotoksycznością w stosunku do komórek kontrolnych, natomiast pochodna **KL3** działa cytotoksycznie w mniejszych stężeniach niż PPT w 3 z 6 badanych liniach nowotworowych i jest 2 -razy mniej cytotoksyczna dla komórek kontrolnych
- W analizę z wykorzystaniem mikroskopu pokazano wpływ pochodnej **KL3** w i macierzystej PPT na morfologię i konfluencję komórek mysich fibroblastów, wskazując na podobny efekt i mechanizm działania obu testowanych substancji.

W mojej opinii najważniejszym osiągnięciem tej pracy jest synteza pochodnej która wykazuje niższe działania cytotoksyczne dla komórek kontrolnych i wykazuje selektywne działanie w stosunku do komórek nowotworowych w stężeniach niższych niż PPT. Jednak ze względu na fakt, że przeprowadzono tylko jeden test na przeżywalność komórek, nie można na tym etapie mówić o



przeciwnowotworowym działaniu badanych pochodnych. W przeprowadzonym teście wykazano że KL3 jest tylko 2 razy mniej toksyczna niż PPT dla komórek kontrolnych aczkolwiek wykazuje działanie toksyczne w równych/nieższych stężeniach niż PPT dla 5 z 6 badanych linii komórkowych. Moje pytanie do doktoranta dotyczy przyszłości KL3 i badania molekularnych mechanizmów działania w komórkach nowotworowych – czy Doktorant podejmie takie działania?

„Novel podophyllotoxin and benzothiazole derivative induces transitional morphological and functional changes in HaCat cells”

W pracy tej przeprowadzono szczegółowe badania w których analizowano mechanizm działania PPT i pochodnej KL3 w komórkach nienowotworowych HaCat oraz jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej PBMC po inkubacji 24 i 48 godzin. Potwierdzono że nowa pochodna wykazuje niższą cytotoksyczność niż związek bazowy w obu badanych liniach. W stężeniu 1 uM nie zaburza metabolizmu energetycznego komórki, i nie indukuje procesu apoptozy i nekrozy. Uważam, że bardzo ciekawym i ważnym wynikiem, co również podkreśla Doktorant, jest analiza morfologii komórek za pomocą mikroskopu elektronowego. Wykazano, że po 24 godz. inkubacji z KL3 komórki mają cechy stresu siateczki endoplazmatycznej i zmiany w mitochondriach, które po 48 godz. ulegają już regresji. Wskazuje to na proces adaptacji komórek do warunków w których pojawia się ekspozycja na KL3. W mojej ocenie jest to bardzo wartościowa praca, która uzupełnia wiedzę na temat mechanizmów działania PPT w komórkach nienowotworowych, co jest bardzo ważne w aspekcie potencjalnego wykorzystania pochodnej w medycynie.

Cellular Distribution and Ultrastructural Changes in HaCat Cells Induced by Podophyllotoxin and Its Novel Fluorescent Derivative, Supported by the Molecular Docking Studies”

W pracy opisano, jak to podkreśla doktorant unikatową syntezę fluorescencyjnej pochodnej PPT (PPT-FL). Wyniki pozwoliły na określenie komórkowej dystrybucji podofilotoksyny. Wykonano również doświadczenia których celem była analiza toksycznego działania PPT w komórkach HaCaT. W pracy tej wykorzystano nowoczesne metody badawcze (m.in. dokowanie molekularne, mikroskop transmisyjny czy mikroskop konfokalna), a z załączonych oświadczeń wynika że Doktorant miał aktywny udział w wykonywaniu opisanych eksperymentów. W Podsumowaniu i Wnioskach Doktorant wymienia najważniejsze wyniki i wnioski z powyższej publikacji, których ja nie będę już powielać. Najważniejszym osiągnięciem omawianej pracy jest perspektywa wykorzystania fluorescencyjnej pochodnej PPT do śledzenia dystrybucji PPT w komórce co może być niezwykle ważne w badaniach farmakologicznych.

The Effect of Podophyllotoxin Derivatives on Noncancerous Diseases: A systematic review”

Cykl zamyka praca przeglądowa która została opublikowana w roku 2025. Doktorant w oparciu o zasoby bazy PubMed, MEDLINE, Embase i Web of Science opisuje zastosowanie podofilotoksyny i jej pochodnych w leczeniu chorób nie związanych z nowotworami. W pracy zebrano wyniki badań opublikowanych od stycznia 2013 roku do stycznia 2025, w wyniku przejętych przez autorów



kryteriów w pracy finalnie zacytowano 82 artykuły. W pierwszej kolejności przedstawiono wyniki dotyczące toksycznego działania PPT i jej pochodnych w komórkach nienowotworowych, wskazując że toksyczne działanie związków opiera się na indukcji stresu metabolicznego w mitochondrium, jak również zaburza metabolizm białek w ER i Aparacie Golgiego, opisano również że może zaburzać embriogenezę. PPT i jej pochodne mogą mieć jednak zastosowanie w leczeniu stanów zapalnych i wykazują działanie przeciwbólowe. Opisano również potencjalne zastosowanie w leczeniu brodawek narządów płciowych wywołanych HPV. PPT i jej pochodne mają również obiecujące wyniki w leczeniu zakażenia wirusem Dengi i SARS-CoV-2 a ponadto wykazano jej działanie radioprotekcyjne. W mojej ocenie praca ta bardzo dobrze uzupełnia część doświadczalną niniejszej dysertacji. Wysoki udział indywidualny Doktoranta w opracowywaniu tej publikacji świadczy o dojrzałości naukowej i krytycznym podejściu do dostępnych danych naukowych oraz bardzo dobrej umiejętności analizy opublikowanych badań.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na fakt, że niniejsza rozprawa doktorska nie jest wolna od pewnych niedociągnięć redakcyjnych. W części opisowej pojawiają się niefortunne określenia, czy zbyt „daleko idące wnioski”. Szczegółowe zastrzeżenia przekażę Doktorantowi osobiście. Nie umniejsza to jednak wartości i mojej ogólnej oceny przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej. Przedstawiony przez Doktoranta cykl publikacji, jak również część opisująca wyniki i najważniejsze osiągnięcia przeprowadzonych badań wskazują na dojrzałość naukową Pana Piotra Strusa. Podsumowując, zwracam się z prośbą do Doktoranta o ustosunkowanie się do wspomnianych powyżej uwag. Jestem także ciekawa czy Doktorant będzie kontynuował prace badawcze dotyczące pochodnej KL3 głównie jej potencjalnego mechanizmu działania w komórkach nowotworowych oraz czy widzi potencjał terapeutyczny tej pochodnej w dziedzinie laryngologii.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska lekarza Piotra Strusa „Pochodne podofilotoksyny i benzotiazolu jako leki przeciwnowotworowe – optymalizacja struktury i badanie mechanizmu działania” spełnia wszystkie warunki i wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2024 r. poz.1571)

Wnoszę do Rady Dyscyplin Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie lek. Piotra Strusa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Podpisany elektronicznie przez
Emilia Klementyna Grosicka-Maciąg

19.05.2025

11:14:01 +02'00'