

Akceptu /s/
04.06.2025
T. Jachimiowicz

Recenzja

rozprawy doktorskiej lekarza Piotra Strusa pt. „Pochodne podofilotoksyny i benzotiazolu jako leki przeciwnowotworowe- optymalizacji struktury i badanie mechanizmu działania”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska powstała pod kierunkiem dr hab. n. med. Izabeli Młynarczuk-Biały w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie. Celem zawartych w rozprawie badań było opracowanie i przetestowanie nowych pochodnych podofilotoksyny, które będą bardziej skuteczne i mniej toksyczne dla ludzkich komórek niż podofilotoksyna. W szczególności sformułowano 2 pytania badawcze:

1. Czy badane pochodne podofilotoksyny (w skrócie PPT) oznaczone jako KL1, KL2, KL3 są mniej toksyczne dla nienowotworowych linii komórkowych i bardziej skuteczne przeciwko komórkom nowotworowym niż sama PPT?
2. Czy badane substancje (KL1, KL2, KL3) mają ukierunkowane mechanizmy działania?

Rozprawa jest cyklem 4 publikacji uzupełnionych o streszczenia (w języku polskim i angielskim), wstęp, podsumowanie i wnioski, bibliografię, opinię komisji bioetycznej lub etycznej, oświadczenia wszystkich współautorów publikacji.

Poniżej omówiono poszczególne części rozprawy:

We wstępie rozprawy przedstawiono główne wyzwania współczesnej onkologii, krótki zarys historyczny zastosowania PPT w medycynie człowieka oraz uzasadnienie wyboru benzotiazolu jako składowej jednego z badanych związków. **Założenia i cel pracy** zostały zawarte w podrozdziale 1.2, który stanowi część wstępu. Założenia i cel pracy zostały jasno sformułowane, choć – moim zdaniem – warto byłoby je wyodrębnić w osobnym rozdziale, co podkreśliłoby ich znaczenie i ułatwiło orientację czytelnikowi.

Kolejnym elementem wstępu jest podrozdział zatytułowany „Znaczenie projektu”, w którym omówiono cele badawcze oraz proces syntezy związków, akcentując jego innowacyjność wynikającą z niskiego kosztu produkcji oraz przyjazności dla środowiska. Ostatni podrozdział nosi tytuł „Połączenie serii publikacji” i zawiera omówienie cyklu załączonych artykułów oraz informacji o konferencjach naukowych, na których Doktorant prezentował – z wieloma sukcesami – wyniki swoich badań. Uważam, że tytuł tego podrozdziału mógłby zostać doprecyzowany – np. jako „Omówienie cyklu publikacji”, co lepiej oddawałoby jego treść.

W mojej opinii wstęp został potraktowany zbyt ogólnikowo. W części dotyczącej mechanizmu działania PPT wspomniano jedynie, że jest to inhibitor polimeryzacji tubuliny. Nie przedstawiono również badanych pochodnych PPT (KL1, KL2, KL3). Choć informacje te można znaleźć w załączonych publikacjach, ich choćby zwięzła charakterystyka we wstępie znacznie uporządkowałaby strukturę pracy i ułatwiła jej odbiór.

We wstępie zauważyłam także kilka uchybień stylistycznych, polegających na użyciu potocznych wyrażen, takich jak: „literatura obfituje”, „gatunek należy do rodziny Berberidaceae, która szczyli się...”, czy „głównym celem jest sprawienie...”. Zastosowanie bardziej formalnego języka byłoby wskazane w pracy o charakterze naukowym.

Cykl publikacji stanowi 4 prace. Trzy publikacje są to oryginalne prace badawcze. Trzy z 4 załączonych publikacji zostały opublikowane w czasopiśmie z bazy Journal Citation Report. Sumaryczny impact factor publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 13,585. Suma punktów MNiSW wynosi 380. We wszystkich publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem co wskazuje na jego kluczową rolę w realizacji projektu będącego podstawą rozprawy doktorskiej. Potwierdzają to również załączone oświadczenia pozostałych współautorów publikacji.

W publikacji nr 1. pt. *„Novel podophyllotoxin derivatives as Anticancer Agents: Design, Synthesis and Biological Screening”* opublikowanej w formie rozdziału w książce „Advances in Biomedical Research” wydanej przez Wydawnictwo Naukowe TYGIEL (2018) przedstawiono potencjalny mechanizm działania PPT polegający na zatrzymaniu cyklu komórkowego podczas mitozy i blokowaniu tworzenia się wrzeciona kariokinetycznego. Opisano też syntezę badanych pochodnych PPT i ich spodziewany wpływ na komórki nowotworowe. Celem pracy było zbadanie efektu cytotoksycznego i cytostatycznego badanych pochodnych w 7 liniach komórkowych (HeLa, MDA-MB-231, MCF-7, PC-3, DU-145, CFPAC-1, NIH-3T3). Zbadano również cytotatyczny efekt KL 3 w mysich fibroblastach (linia NIH-3T3). Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że badane pochodne PPT są mniej toksyczne od samej PPT. Wykazano, że pochodna KL3 (koniugat PPT i ugrupowania benzotiazolowego) jest najbardziej efektywna w indukowaniu cytotoksyczności i cytostatyczności w badanych komórkach nowotworowych, z wyjątkiem komórek MCF7. Co ciekawe pozostałe 2 pochodne: KL1 oraz KL2 wykazały dużą efektywność w indukowaniu cytotoksyczności/cytostatyczności w tej linii komórkowej.

W publikacji 2. pt. *„Novel podophyllotoxin and benzothiazole derivative induces transitional morphological and functional changes in HaCaT cells”* opublikowanej w *Toxicology in Vitro* (2021) badano wpływ pochodnej KL3 (koniugatu PPT i ugrupowania benzotiazolowego) na morfologię komórek, proces apoptozy, autofagię oraz syntezę ATP w komórkach keratynocytów (HaCaT). Zbadano również przeżywalność jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PMBC) po 48 godzinnej ekspozycji na pochodną KL3. W tekście publikacji można znaleźć uzasadnienie, że wybór takich linii komórkowych podyktowany był wcześniejszymi badaniami wpływu KL3 na te komórki, niestety nie podano stosownej referencji w tekście. Przeprowadzone badania są kompleksowe, a metody dobrze dobrane. Zgromadzone wyniki wskazują, że KL3 w odróżnieniu od PPT

użyty w niskim stężeniu 1uM wykazuje tylko nieznaczną toksyczność w kierunku nienowotworowej linii keratynocytów (HaCaT). Stężenie to jest jednocześnie wyższe od IC50 dla linii HeLa, MDA-MB-231 oraz PC3 co wykazano w publikacji nr 1. KL3 w badanej dawce nie wpływał cytotoksycznie na komórki PBMC. Na podstawie przeprowadzonych badań zaproponowano również mechanizm działania KL3 w komórkach, polegający na zatrzymaniu cyklu komórkowego w fazie G2/M poprzez wpływ na mechanizm transportu mikrotubul.

W publikacji nr 3. pt. *"Cellular Distribution and Iltrastructural Changes in HaCaT Cells Induced by P*Od*ophyllotoxin and Its Novel Fluorescent Derivative, Supported by the Molecular Docking Studies"* opublikowanej w *Journal of Molecular Science* (2024) potwierdzono silne działanie cytotoksyczne wobec keratynocytów (linia HaCaT). Zaprojektowano również fluorescencyjną pochodną PPT (PPT-FL). Wykonano badania dystrybucji w komórkach oraz dokowania molekularnego dla PPT oraz PPT-FL, które pozwoliły na lepsze poznanie mechanizmu działania PPT w komórkach. Dodatkowo, wykazano, że PPT-FL może służyć jako narzędzie do dalszych badań nad PPT. Biorąc pod uwagę sformułowane przez Doktoranta pytania badawcze oraz przedstawiony w publikacji „warsztat metodyczny”, jestem ciekawa, czy możliwe byłoby synteza fluorescencyjnej pochodnej badanych związków: KL1, KL2, KL3? Pozwoliłoby to na lepsze poznanie ich mechanizmów działania w komórkach. Zgromadzone wyniki sugerują, że ze względu na dużą masę cząsteczkową fluoresceina może nie być najlepszym fluorochromem do tego rodzaju badań co pokazały badania dokowania molekularnego. Chętnie wysłucham opinii Doktoranta na obronie. **Publikacja nr. 4** pt. *"The effect of Podophyllotoxin Derivatives on Noncancerous Disease: A Systemiatic Review"* opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences* (2025) jest przeglądem systematycznym wykonanym z dużą starannością metodyczną. Publikacja ta wskazuje na potencjalne zastosowanie pochodnych PPT również w terapiach schorzeń niezwiązanych z nowotworami. Choć zakres tematyczny tej publikacji nie odpowiada bezpośrednio na postawione przez Doktoranta pytania badawcze jest ważny dla usystematyzowania dostępnej wiedzy. Przedstawione w publikacji badania dowodzą, że różne pochodne PPT mogą mieć różne właściwości, a co za tym idzie odmienne mechanizmy działania. Publikacja ta wskazuje również na wielokierunkowe podejście Doktoranta do tematu badań na PPT.

W rozdziale „**Podsumowanie i wnioski**” przedstawione zostało szczegółowe i czytelne podsumowanie uzyskanych wyników oraz ich znaczenie. Zgromadzone wyniki wskazują, że możliwość syntezy nowych pochodnych podofilotoksyny nadaje tej klasie leków wysoki potencjał terapeutyczny. Podzielam opinię Doktoranta, że badanie stabilności, biodystrybucji w komórkach, efektywności i selektywności przeciwnowotworowej jak również mechanizm regeneracji komórek nienowotworowych stanowi kompleksowe podejście do tematu badań nowych cząsteczek o potencjale przeciwnowotworowym w układzie *in vitro*. Zgadzam się również, że potrzebne są dalsze pogłębione badania, w tym badania przedkliniczne.

Bibliografia stanowi 41 pozycji. Pozostałe części pracy nie wymagają omówienia.

Podsumowując, rozprawa doktorska lekarza Piotra Strusa zawiera oryginalne, wartościowe wyniki, które uzyskano stosując poprawną metodologię. **Rozprawa całkowicie spełnia warunki określone w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Dlatego pozwalam sobie wnioskować do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie lekarza Piotra Strusa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Z wyrazami szacunku,

Małgorzata Stępień-Ziemnińska

Warszawa, 2.06.2025 r.