



|                            |
|----------------------------|
| PAN - Instytut Immunologii |
| Wpł. dnia 31-01-2023       |
| L.dz. 28                   |

Poznań, dn. 26.01.2023

Prof. dr hab. Piotr Przybylski  
Zakład Chemii Produktów Naturalnych

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Cuprych-Belter

pt. „*Synteza oraz badanie aktywności biologicznej izotiocyanianów wobec linii komórkowych raka pęcherza moczowego*”

Przedłożona do oceny praca doktorska została wykonana w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod kierunkiem Pani prof. dr. hab. Joanny Wietrzyk i dr hab. Inż. Marcina Sieńczyka, prof. PWR a głównym obszarem pracy jest dziedzina nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplina - nauki biologiczne.

Praca doktorska dotyczy niezwykle aktualnego i ważnego problemu jakim są choroby nowotworowe, które to wywołane m.in. czynnikami cywilizacyjnymi przyczyniają się do pogorszenia jakości życia ludzi, coraz większej śmiertelności, oraz lawinowo narastających wydatków na ochronę zdrowia. Szczególny przypadek nowotworu jakim jest rak pęcherza moczowego, należący do chemioopornych i przekształcających się często w postać złośliwą, jest ostatnio dość intensywnie badany w różnych obszarach: medycznym, biologicznym a także chemicznym m.in. pod kątem opracowania strategii, uniemożliwiających lub utrudniających jego rozwój w organizmie człowieka. Najlepszym dowodem aktualności tematyki i wagi problemu podjętego przez Doktorantkę jest ilość prac naukowych dotyczących nowotworu pęcherza moczowego, które ukazały się w latach 2020-2022 tj. około 15 000 co daje 5000 publikacji/rok (w/g bazy *Scopus*, styczeń 2023). Przesłana do oceny dysertacja mgr. Moniki Cuprych-Belter, która powstała we współpracy z chemikami organikami, łączy elementy chemii (synteza i charakterystyka wybranych izotiocyanianów; ITC) z wyraźnie dominującą częścią biologiczną: wyprowadzenie i charakterystyka opornych linii nowotworowych (ocena rozwoju oporności krzyżowej komórek rakowych, indeksy RI, analiza profilu linii nowotworowych /w tym ekspresji wybranych genów i poziomu wybranych białek; analiza poziomu stężenia glutationu

Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań  
tel. +48 61 829 1693, e-mail: piotrp@amu.edu.pl

[www.chemia.amu.edu.pl](http://www.chemia.amu.edu.pl)

zredukowanego vs. utlenionego GSH/GSSG) + ocena wpływu działania biologicznego izotiocyanianów na: wybrane linie rakowe (testy aktywności przeciwnowotworowej metodą SRB; IC<sub>50</sub>), aktywność kaspaz, apoptozę, właściwości klonogenne i zmiany w cyklu komórkowym komórek nowotworowych, poziom wybranych białek w lizatach linii komórkowych raka pęcherza moczowego, na ekspresję i proces polimeryzacji tubulin ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), stosunek poziomu stężeń glutationu GSH/GSSG) z jednoczesnym wykorzystaniem technik obrazowania (tubulin - mikroskopia fluorescencyjna) co nadaje jej pewien charakter interdyscyplinarny i wydaje się być spójne z proponowanym tematem rozprawy. Sam pomysł wykorzystania izotiocyanianów przeciwko nowotworom jest już znany w literaturze od lat a grupa izotiocyanianowa w strukturze związków chemicznych **niesie ze sobą pewne korzyści biologiczne dla nas** jak np. wpływ na podwyższenie stężenia białka p53, obniżenie ekspresji białek Bcl-2 i indukowanie apoptozy przez zwiększenie stężenia białek Bax uniemożliwiają proliferację komórek nowotworowych (wpływ na tworzenie kompleksów międzybiałkowych, asocjacja z błonami mitochondriów, stymulacja procesu uwolnienia cytochromu c z mitochondriów, tworzenie apoptosomów, aktywację kaskadową kaspaz i destrukcję kluczowych białek np. cytoszkieletowych) czy też preferencyjne reakcje z resztami cysteiny *in vivo* w układach biologicznych (sprzężanie z glutationem GSH) **tak jak i „wady”** - duża reaktywność chemiczna grupy izotiocyanianowej w reakcjach z innego typu nukleofilami np. azotowymi czy tlenowymi może przyczyniać się do szybkiej transformacji w inny związek chemiczny *in vivo* w komórkach (nieoczekiwany wielokierunkowy metabolizm izotiocyanianów) gdzie może teoretycznie pojawić się toksyczność wobec zdrowych komórek. A zatem wykorzystanie tej grupy związków w sposób efektywny i kontrolowany (selektywny) przeciwko komórkom nowotworowym stanowi wyzwanie w świetle powyższych informacji a także dalszych doniesień literaturowych na temat tego iż: spożycie np. warzyw kapustowatych, zawierających m.in. izotiocyaniany: allilu (AITC), benzylu (BITC), fenetylu (PEITC) czy izotiocyanianu sulfotlenku metylo-butylowego – sulforafanu (SFN) ale i ... też zawierających odpowiednie nitryle czy izocyjaniany pochodzące z katabolizmu glukozynolanów przez mirozynazy (*S*-glikozydazy) wiąże się z ogólną obniżoną zachorowalnością na nowotwory, o ich wielu celach molekularnych i jednocześnie **sprzecznych** doniesieniach literaturowych o skrajnie niskiej toksyczności (efektach ubocznych) tej klasy związków jak i jednocześnie np. hepatotoksyczności ... Zdolność

do akumulacji ITC w moczu i tkance pęcherza moczowego racjonalizują w wysokim stopniu dobór przez Doktorantkę związków (typu pochodnych) przeznaczonych do walki z wybranymi liniami nowotworowymi.

*Ocena organizacji dysertacji i formy jej prezentacji i tła literaturowego*

Praca doktorska liczy 238 stron i zawiera 38 rycin i 38 tabel i 2 schematy reakcji, których spis został umieszczony pod koniec dysertacji. Już w tym miejscu należy zaznaczyć, że spis tabel i rycin byłby konieczny z podpisami gdyby odpowiednie podpisy nie zostały umieszczone już w samej dysertacji. **Nie jest też jasnym dlaczego w spisie tabel, rycin i rysunków umieszczonym na końcu dysertacji dotyczące ich podpisy nie są tożsame z tymi występującymi w dysertacji** (np. Ryc. 18, Ryc. 25 etc.). Praca została podzielona raczej w sposób klasyczny na rozdziały opisujące odpowiednio: streszczenie (2 strony), wykaz używanych skrótów (8 stron), wstęp (53 strony), zwięzło sformułowany cel pracy (1 strona), materiały i metody (41 stron), uzyskane wyniki (68 stron) i ich dyskusję (18 stron), wnioski (1 strona), spis literatury (16 stron) a także wspomniany już spis rycin, tabel i rysunków (6 stron) i spis dorobku naukowego i wystąpień Doktorantki (2 strony). Zatem układ i proporcje rozprawy (128 stron dysertacji stanowi opis eksperymentów i dyskusja wyników z wnioskami tj. ponad połowa dysertacji) nie budzą zastrzeżeń. Może można by było bardziej wyeksponować formalny cel pracy (na początku dysertacji) ale jest to oczywiście kwestia indywidualnego spojrzenia. Autorka po części to zrobiła opisując cel w streszczeniu pracy... **O wartości naukowej ocenianych dysertacji nie decyduje oczywiście ilość zapisanych stron a jej oryginalność i zawartość merytoryczna, która w świetle znaczenia uzyskanych przez Doktorantkę wyników biologicznych przedstawia się obiecująco.** Praca jest napisana naprawdę poprawnym językiem i tylko w nielicznych przypadkach można było doszukać się drobnych błędów edytorskich, literówek, niezręcznych sformułowań, których wybrane przykłady wymieniam poniżej:

- 1) str. 91, „aldehydu 3-fosforanowego gliceryny”
- 2) str. 101, „tionulu”
- 3) str. 102 „izokrata”

4) str. 145, „ocnę”

5) str. 206, „związki o najprostszycy i najkrótszych strukturach” (?)

6) str. 155 „... zdecydowano,, iż w trakcie drugiej syntezy powstaną związki zawierające wyłącznie estry metylowe izotiocyanianów...” (?)

7) str. 204 „pierścienia fenyłowego” (?) etc.

Część teoretyczna pracy została kompetentnie opisana w oparciu o aktualną literaturę i najnowszy stan wiedzy, poruszając kwestie epidemiologii, czynników ryzyka oraz diagnostyki badanego w pracy nowotworu pęcherza moczowego na tle krajowym. Poruszona została tutaj klasyfikacja histopatologiczna nowotworów pęcherza moczowego czy też problem markerów molekularnych oraz opisane zostały strategie stosowane w leczeniu tego typu nowotworów. Dalej we wstępie zostały opisane procesy lekooporności nowotworów na stosowane terapeutyki i kwestie związane z abundancją izotiocyanianów w przyrodzie, enzymów biorących udział w katabolizmie tych związków oraz trochę miejsca zostało poświęcone efektom biologicznym towarzyszącym użyciu izotiocyanianów *in vivo*. Całość części teoretycznej z pewnością daje dobre tło i wprowadza w tematykę pracy. **Ciekawym jest fakt iż we wprowadzeniu teoretycznym do pracy struktury izotiocyanianów są przedstawione prawidłowo podczas gdy w części eksperymentalnej już nie, tj. z błędnymi kątami międzywiązaniami (Tabela 27, str. 146) a w przypadku izotiocyanianu estru metylowego  $\alpha$ -metyloalaniny (ITC-Aib-OMe, Tabela 27, str. 149) zastosowano generalnie błędny wzór chemiczny – brak grupy izotiocyanianowej w związku (?).**

#### *Obiekt badań biologicznych - izotiocyaniany*

W mojej opinii charakterystyka obiektu badań biologicznych czyli analizowanych pochodnych izotiocyanianowych pozostawia „lekką” mówiąc niedosyt, nawet mając na uwadze fakt, że Doktorantka nie jest chemikiem... Jako chemik organik uważam, że słowo „**synteza**” w tytule dysertacji oraz **jeden z trzech postawionych głównych celów dysertacji – „synteza izotiocyanianów”, w świetle dalszych ich badań biologicznych zobowiązuje do przedstawienia „twardych” danych (poprawnej charakterystyki spektralnej) w celu**

**ewentualnego późniejszego powtórzenia eksperymentów dokładnie z tymi samymi związkami.** Autorka opisuje, że obiektem badań biologicznych jest szereg izotiocyjanianów tj. 29 związków (I seria 18 + II seria 11) przedstawionych w Tabeli 27 na str. 146 – 149. Dalej Doktorantka opisuje, że z tych 29 związków we współpracy z dr. inż. Łukaszem Winiarskim otrzymała sześć: ITC-Ala-OiPr; ITC-Ala-OHeks; ITC-Phe-OiPr; ITC-Phe-OHeks; ITC-Phg-OiPr; ITC-Phg-OHeks, których „charakterystykę  $^1\text{H NMR}$ ” przedstawiła w Tabeli 28. **W/g uznawanych standardów publikacyjnych w międzynarodowych czasopismach recenzowanych na świecie o dobrej reputacji taka charakterystyka materiału do badań tj. badanych ITC nie jest wystarczająca.** Co mam na myśli - jeżeli wyprowadzane są nowe odporne rakowe linie komórkowe to przedstawiane są odpowiednie dane w celu ujawnienia ich profilu biologicznego (charakterystyki) i analogicznie powinno to zostać wykonane od strony testowanych związków. Doktorantka przedstawiła w dysertacji „charakterystykę” dla 6 z 29 związków jedną wybraną metodą tj.  $^1\text{H NMR}$  podczas gdy do pełnej charakterystyki nowych związków wymagane są przynajmniej trzy niezależne metody (do wyboru np. HR MS;  $^1\text{H NMR}$ ,  $^{13}\text{C NMR}$ , FT-IR, UV-vis), przy czym HPLC nie jest brane z oczywistych względów pod uwagę (chromatogram można przedstawić ujawniając wyłącznie czystość związku i to jeszcze nie w każdym przypadku [!]). Pozostaje też pytanie o charakterystykę pozostałych izotiocyjanianów badanych biologicznie przez Doktorantkę a zsyntezowanych przez dr. hab. Tomasza Goszczyńskiego /IITD PAN, Laboratorium Chemii Biomedycznej, Zakład Onkologii/ i dr inż. Waldemara Goldemana /PW, Wydział Chemii, Katedra Chemii Organicznej/, która nie została ukazana w ocenianej dysertacji ani chyba do tej pory opublikowana... (?) Niestety nie znalazłem załączonych kopii widm  $^1\text{H NMR}$  otrzymanych związków ani ich **pełnej** charakterystyki .... a i w tej przedstawionej w Tabeli 28 znajdują się intrygujące dane. Dla pochodnej np. ITC-Phe-OiPr Doktorantka podaje dla dubletów przy 1,25 ppm i 1,23 ppm stałą sprzężenia  $J = 1,1 \text{ Hz}$  ... **co jest wynikiem mało prawdopodobnym – tak niska stała sprzężenia nie jest oczekiwana dla analizowanego związku a zatem albo związek postulowany ma inną strukturę albo otrzymany wynik został źle zinterpretowany (proszę o komentarz).** Ten sam problem występuje w Tabeli 28 dla związku ITC-Phe-OHeks dla którego jedna ze stałych sprzężeń ma przypisaną kontrowersyjną wartość  $J \sim 22 \text{ Hz}$  dla sygnału przy 3,16 ppm (ddd)? - **proszę o komentarz.** W tym miejscu nasuwa się pytanie czy i jak Doktorantka uczestnicząc

w syntezie związków i ich charakterystyce weryfikowała poprawność przypisania sygnałów w widmach  $^1\text{H}$  NMR? Czy otrzymane związki zostały scharakteryzowane innymi metodami (jeżeli tak to poproszę o przykład)? Jak dokładnie określano czystość związków dalej poddawanych badaniom biologicznym? Innym problemem jest to, że większość z izotiocyjanianów zostały poddane badaniom biologicznym jako racematy... a znamy przecież już niejeden przykład mieszanin racemicznych, w których tylko jeden z enancjomerów wykazywał pożyteczną aktywność biologiczną a drugi był teratogenem, hamującym angiogenezę w rozwijających się kończynach – patrz znany problem z talidomidem.

*Badania antyproliferacyjne i związane z ustaleniem mechanizmu działania analizowanych ITC*

W części biologicznej, która jest głównym obszarem zainteresowań Doktorantki, wykonana została solidna praca, której nie można by było zrealizować bez pełnego zaangażowania i wysokiego poziomu warsztatowego Doktorantki. Przede wszystkim trzeba wspomnieć o tym, że Doktorantka wykazała się talentem eksperymentalnym podczas przygotowywania sobie zaplecza biologicznego do badań tzn. wyprowadzenia i charakterystyki linii komórkowych raka pęcherza moczowego np. linii UM-UC-3 opornych na cisplatynę (CDDP), winblastynę (VBL), gemcytabinę (GEM) oraz cisplatynę i gemcytabinę (CDDP/GEM) gdzie wykonała ponad 100 pasaży w ciągu roku. Doktorantka w sumie przeprowadziła kompleksową charakterystykę profilu komórek 12 linii lekoopornych raka pęcherza moczowego i 3 linii referencyjnych – zatem kolekcja linii do badań eksperymentalnych była imponująca (!), szczególnie w aspekcie analizowanego typu nowotworu. Wszystkie wartości  $\text{IC}_{50}^{(72\text{h})}$  zostały zaopatrzone w dane dotyczące rozpiętości tych wartości w kolejnych oznaczeniach (w nawiasach). Badane biologicznie izotiocyjaniany były analizowane etapowo tzn. najpierw wstępnie oceniono ich aktywność (metodą SRB) wobec panelu linii komórkowych (referencyjnych i lekoopornych) raka pęcherza moczowego gdzie otrzymano perspektywiczne wyniki na poziomie  $\text{IC}_{50}^{(72\text{h})}$  rzędu  $\mu\text{M}$ . Najaktywniejszym był związek z kodem ITC-Phe-OiPr, którego aktywność antyproliferacyjna była wyższa niż tych naturalnie występujących izotiocyjanianów wobec linii komórkowych: UM-UC-3, UM-UC-3<sup>CDDP</sup>, UM-UC-3<sup>VBL</sup> i UM-UC-3<sup>CDDP/GEM</sup>. Wobec linii podstawowych i wyprowadzonych lekoopornych ludzkiego raka nabłonka pęcherza moczowego RT-112 aktywne związki ITC-Phe-OiPr i ITC-Phg-OEt wykazały znowu najwyższą i obiecującą aktywność -

$IC_{50}^{(72h)}$  na poziomie 4-5  $\mu M$  (odpowiednio w liniach komórkowych RT-112, RT-112<sup>CDDP</sup> oraz RT-112<sup>VBL</sup>, RT-112<sup>GEM</sup>) a w linii odpornej jednocześnie na cisplatynę i gemcytabinę (RT-112<sup>CDDP/GEM</sup>) najaktywniejszym był ITC-Phe-OHeks. Ta ostatnia pochodna posiadająca podstawnik cykloheksylowy w części estrowej okazała się być najbardziej aktywna również w liniach rodziny raka pęcherza moczowego TCC-SUP na poziomie  $IC_{50}^{(72h)} = 5-11 \mu M$ . W ostatnim zestawie linii komórkowych nowotworu pęcherza moczowego w ramach preselekcji (linie KU-19-19, HT-1376 i 5637) najaktywniejszymi okazały się odpowiednio izotiocyjaniany ITC-Phg-OEt (linie KU-19-19 i 5637) oraz ITC-Phe-OHeks (linia HT-1376). Warty podkreślenia jest fakt iż znakomita większość otrzymanych we współpracy i badanych biologicznie przez Doktorantkę izotiocyjanianów wykazała aktywność antyproliferacyjną wyższą od BITC, PEITC i EtITC. **Tutaj mam uwagę, że wyniki aktywności zebrane w Tabelach mogłyby odnosić się też wprost do innych znanych środków przeciwnowotworowych jak np. doksorubicyny, aktynomycyny D czy też cytarabiny etc., żeby uzyskać bezpośrednie porównanie i lepiej umiejscowić badane ITC w szeregu aktywności oraz ukazać szersze korzyści z ich zastosowania.**

W dalszej części Doktorantka analizując statystycznie wyniki wyłoniła pochodne izotiocyjanianowe, które w części estrowej posiadały stosunkowo niewielki objętościowo podstawnik tj. grupę metylową, etylową i izopropylową. Doktorantka mając na uwadze powyższą zależność struktura-aktywność (SAR) i najlepsze wydajności otrzymywane we wstępnej fazie syntez logicznie wybrała podstawnik metylowy w części estrowej dla kolejnych 11 syntezowanych izotiocyjanianów zawierających różne centralne motywy aminokwasowe. **W tym miejscu jednak osobiście próbowałbym jeszcze uzyskać pewną asekurację w perspektywie interpretacji kolejnych wyników włączając do dalszej fazy testów i dyskusji SAR pochodne o zróżnicowanej strukturalnie części aminokwasowej posiadające w części estrowej dla kontrastu duży podstawnik np. podstawnik cykloheksylowy - ze względu na ciekawą aktywność antyproliferacyjną pochodnej ITC-Phe-OHeks(!). Poza tym interesującym było by wykonanie testów pochodnych ITC w wybranej normalnej linii komórkowej (np. fibroblasty czy też inne np. komórki wątroby) aby zweryfikować informacje o toksyczności wobec zdrowych komórek (wyznaczyć indeksy selektywności). W kolejnej serii pochodnych testowanych na linii rodziny UM-UC-3 najaktywniejszymi były pochodne ITC zawierające estry**

metylowe oparte na strukturze Gly, Ala,  $\beta$ Ala i GABA, czyli pochodne o mniejszych objętościowo centralnych częściach aminokwasowych (za wyjątkiem GABA). Do analizy mechanizmu działania tych wybranych, najaktywniejszych izotiocyanianów włączono również dla kontrastu mniej aktywną pochodną ITC-Aib-OMe ( $IC_{50}^{(72h)} = 21,7-29,5 \mu M$ ). Najbardziej wrażliwymi na działanie najaktywniejszych izotiocyanianów ITC-Gly-OMe, ITC-Ala-OMe, ITC- $\beta$ Ala-OMe i ITC-GABA-OMe jak i mniej aktywnej pochodnej ITC-Aib-OMe okazały się linie komórkowe UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> i UM-UC-3<sup>GEM</sup> stąd wymienione linie brano pod uwagę w dalszych badaniach mających na celu wyjaśnienie mechanizmu działania analizowanych związków. Dla testowanych ITC odnotowano statystycznie istotny wzrost aktywności kaspazy-3 przy wyższych stężeniach związków  $c = 15 \mu M$  (ITC-GABA-OMe, ITC-Gly-OMe, ITC- $\beta$ Ala-OMe i ITC-Ala-OMe) w badanych liniach natomiast w linii UM-UC-3<sup>GEM</sup> związki ITC-GABA-OMe i ITC-Gly-OMe zwiększały aktywność kaspazy-3 już przy  $c = 5 \mu M$ . Wybrany jako „związek odniesienia” ITC-Aib-OMe w testach nie przyczyniał się do wzrostu aktywności kaspazy-3. Najaktywniejszymi związkami w aktywacji kaspazy-3 w wybranych liniach komórkowych były te z mniejszymi objętościowo centralnymi częściami aminokwasowymi tj. ITC-Gly-OMe i ITC- $\beta$ Ala-OMe. Analiza liczby komórek apoptotycznych, nekrotycznych i żywych po zastosowaniu ITC wykazała, że cztery z pięciu badanych związków spowodowały zróżnicowane zmiany w liczbie w/w komórek w badanych liniach komórkowych podczas gdy ITC-Aib-OMe (zawierający rdzeń  $\alpha$ -metylo-Ala) takiego efektu nie wywołał. Sugerując się wynikami wcześniejszych badań z literatury, Doktorantka następnie oceniła wpływ wybranych ITC na cykl komórkowy wykorzystując BRdU (bromodeoksyurydynę) i PI (jodek propidyny). W wyniku przeprowadzonych badań stwierdziła, że podobnie jak przy analizie komórek apoptotycznych, cztery z pięciu ITC powodowały zmianę w liczbie komórek w fazach G0/G1, S oraz G2/M w liniach UM-UC-3, UM-UC-3<sup>VBL</sup> i UM-UC-3<sup>GEM</sup>, przy czym najaktywniejszym w tym procesie wydawał się związek ITC-GABA-OMe a kompletnie nieaktywnym związek ITC-Aib-OMe, niezależnie od użytej linii komórkowej. Również cztery z pięciu badanych pochodnych ITC spowodowały obniżenie potencjału klonogenego w badanych liniach (przy czym najbardziej w linii UM-UC-3<sup>VBL</sup>), w przeciwieństwie do związku ITC-Aib-OMe. Przeprowadzona przez Doktorantkę analiza poziomu glutationu GSH/GSSG w testach z pochodnymi w wybranych liniach nowotworowych wykazała, że wszystkie pochodne aktywne



przeciwnowotworowo przyczyniły się do obniżenia tego stosunku (w trzech liniach) w odniesieniu do komórek kontrolnych podczas gdy pochodna ITC-Aib-OMe zmniejszyła proporcję glutationu GSH/GSSG tylko w dwóch liniach, tj. UM-UC-3 i UM-UC-3<sup>GEM</sup>. Testy kinetyczne ukazały, że najlepszymi inhibitorami polimeryzacji tubuliny okazały się także pochodne ITC posiadające w części estrowej mały podstawnik, takie jak np. ITC-Ala-OMe, dla którego szybkość polimeryzacji tubuliny wynosiła 221,8 RFU/min czy ITC-Ala-OEt dla którego odnotowano wartość 234,7 RFU/min, w obu przypadkach przy  $c=25 \mu\text{M}$ . Doktorantka ustaliła również, że związek ITC-GABA-OMe wpływa na wzrost ekspresji genów kodujących  $\alpha$ -tubulinę (*TUBA8*) i  $\beta$ -tubulinę (*TUBB6*) w dwóch liniach komórkowych (UM-UC-3 i UM-UC3<sup>GEM</sup>) a w linii UM-UC-3<sup>VBL</sup> odnotowano jedynie wzrost ekspresji *TUBA8*. Pochodna ITC-Gly-OMe nie indukowała ekspresji w/w genów w żadnej linii komórkowej, pochodna ITC- $\beta$ Ala-OMe wywoływała jedynie wzrost ekspresji genu *TUBA8* podczas gdy pochodna ITC-Ala-OMe powodowała wzrost ekspresji obu genów w liniach UM-UC-3 i UM-UC3<sup>GEM</sup> a w komórkach UM-UC-3<sup>VBL</sup> przyczyniała się do wzrostu ekspresji genu *TUBB6* – także otrzymane wyniki były dość zróżnicowane. Dalej Doktorantka przeprowadziła analizę poziomu wybranych białek w lizatach komórkowych pod wpływem wytypowanych wcześniej ITC i stwierdziła, że wszystkie pochodne doprowadziły do wzrostu poziomu stężenia białka regulatorowego p21, inhibitora cyklu komórkowego w fazie G2/M. Na zakończenie przeprowadzono obrazowanie mikroskopowe komórek raka pęcherza moczowego pod wpływem ITC i stwierdzono, że prawie wszystkie ITC (za wyjątkiem ITC-Ala-OMe) powodują nieprawidłowy rozkład tubuliny w komórkach oraz jej dekompozycję. W liniach komórkowych UM-UC-3<sup>VBL</sup> i UM-UC3<sup>GEM</sup> ITC oprócz wspomnianego efektu ITC doprowadziły do pojawienia się komórek wielojądrystych oraz tych pozbawionych jądra. Autorka wyciągnęła z tych wielopłaszczyznowych badań biologicznych szereg ciekawych wniosków, m.in. że podwyższenie poziomu białka p21 niekoniecznie musi być związane z rozwojem oporności na cisplatinę – badania w liniach RT-112<sup>CDDP</sup> i UM-UC-3<sup>CDDP</sup> oraz, że oporność komórek na winblastynę nie jest związana ze spadkiem glutationu całkowitego. Z kolei wyniki testów antyproliferacyjnych na komórkach opornych na gemcytabinę uwiaryściły szeroką oporność krzyżową komórek linii TCC-SUP<sup>GEM</sup> (niską na cisplatinę i doksorubicynę ale wysoką na kombretastatynę A4, paklitaksel, winblastynę i winorelbinę), w przeciwieństwie do linii komórkowych RT-112<sup>GEM</sup> i UM-UC-3<sup>GEM</sup>. W

badaniach z ITC wykazano wpływ długości łańcucha alkilowego w strukturze na aktywność antyproliferacyjną (im krótszy tym wyższa aktywność) oraz wpływ rodzaju grupy przyłączonej do tego łańcucha a także, że małe podstawniki w ramach grupy estrowej ITC często gwarantują atrakcyjną aktywność antyproliferacyjną. Doktorantka ustaliła fakt, że za zdolność izotiocyjanianów do hamowania procesu polimeryzacji tubuliny odpowiada w dużej mierze obecność grupy  $-N=C=S$ . **Mając na uwadze labilność strukturalną izotiocyjanianów (ITC), uważam, że interesującym by było przekonać się w jakiej postaci chemicznej są one obecne w badanych liniach komórkowych, jaka jest ich stabilność metaboliczna w komórkach podczas testów – czy Autorka pracy to rozważała?** Przy badaniach z glutationem (GSH/GSSG) Autorka stwierdziła na str. 211, że „Metabolity izotiocyjanianów z glutationem są usuwane na zewnątrz komórki gdzie dochodzi do ich hydrolizy, a uwolnione dzięki temu izotiocyjaniany z powrotem mogą wrócić do komórki [275, 276].” ... **a w wyniku reakcji pomiędzy ITC a GSH tworzy się karbamoditiinian – czy mogłaby Doktorantka wyjaśnić jak z tego związku poprzez hydrolizę miałby z powrotem powstawać ITC (?)**

Doktorantka współopublikowała 4 prace w międzynarodowych czasopismach recenzowanych takich jak: *Life Sci.* (IF=6.78, Elsevier), *Cancers* (IF- 6.575, MDPI), *Invest. New Drug.* (IF = 3.86, Springer) oraz w *Int. J. Mol. Sci.* (IF=6.208, MDPI) ale nie była w żadnej z nich pierwszym Autorem. Udział w tych pracach niewątpliwie wpłynął na poziom i warsztat badań przedstawionych w ramach dysertacji ale żadna z nich nie dotyczy bezpośrednio materiału z dysertacji. Doktorantka również była współautorką trzech komunikatów konferencyjnych (również niezwiązanych z dysertacją) na konferencjach w Polsce (2) i w Hiszpanii (1).

### *Konkluzja*

Uważam, że tematyka pracy jest bardzo interesująca, część doświadczalna pracy doktorskiej (zwłaszcza dotycząca analizy biologicznej) została dobrze zaplanowana a wyniki zinterpretowane poprawnie co doprowadziło do szeregu interesujących wniosków – a zatem dysertacja niesie dużą zawartość merytoryczną. Istnieją pewne „niedociągnięcia” w charakterystyce obiektu badań biologicznych, czyli tytułowych ITC ale wierzę, że Pani mgr Monika Cuprych-Belter rozwieje wszelkie wątpliwości w trakcie publicznej obrony dysertacji. Osobiście jestem pod wrażeniem wielopłaszczyznowej analizy biologicznej ITC z wykorzystaniem

wyprowadzonych lekoopornych linii nowotworowych przez Doktorantkę. Biorąc także pod uwagę fakt, że Doktorantka posiada opublikowane prace naukowe (4) stwierdzam, że przedłożona do oceny dysertacja **spełnia** ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z artykułami 186 i 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym. Zatem wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN **o dopuszczenie mgr Moniki Cuprych-Belter do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora** w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



