

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 20.02.2023.....
L.dz. 58.....

Bydgoszcz 10.02.2023

Prof. dr hab. n. med. Alina Grzanka

Kierownik Katedry i Zakładu

Histologii i Embriologii, CM w Bydgoszczy,

UMK w Toruniu

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Cuprych-Belter pt. „ Synteza oraz badanie aktywności biologicznej izotiocyjanianów wobec linii komórkowych raka pęcherza moczowego”**

**Promotorzy pracy:**

- **prof. dr hab. Joanna Wietrzyk – Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu**
- **dr hab. Inż. Marcin Sieńczyk, prof. uczelni – Politechnika Wroclawska**

Brak wymiernych efektów terapii nowotworów układu moczowego motywuje współczesnych badaczy do poszukiwania nowoczesnych rozwiązań opartych na identyfikacji potencjalnych terapeutów, zwiększając tym samym skuteczność leczenia raka pęcherza moczowego. Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Moniki Cuprych-Belter pozostaje w nurcie aktualnych badań opierających się na ocenie aktywności związków cytotoksycznych wobec komórek nowotworowych, a także skupia się na innowacyjnych terapiach, wykorzystujących przeciwnowotworowe działanie związków naturalnych, które mogą przyczynić się do zwiększenia bezpieczeństwa i skuteczności leczenia. Imponująca wartość merytoryczna wyników uzyskanych w ramach realizacji rozprawy doktorskiej skłania do refleksji nad potencjalnym wykorzystaniem izotiocyjanianów w terapii nowotworów o zróżnicowanym stopniu inwazyjności, w szczególności nowotworów układu moczowego ze względu na zdolność tych związków do akumulacji w pęcherzu moczowym.

Temat ocenianej dysertacji uważam za interesujący i posiadający duże znaczenie poznawcze nie tylko ze względu na obraną tematykę, ale również ze względu na charakter interdyscyplinarny. Badania, których podjęła się Doktorantka, łączą wiedzę z obszaru procesów

komórkowych wraz z chemiczną analizą naturalnych substytutów w perspektywie zwiększenia efektów terapii przeciwnowotworowych raka pęcherza moczowego.

Niniejsza rozprawa doktorska została podzielona na dwie integralne części. Pierwszy etap badań stanowiło wyprowadzenie linii komórkowej raka pęcherza moczowego i charakterystyka molekularna komórek opornych na obecnie stosowane w terapii cytostatyki: cisplatynę, winblastynę, gemcytabinę oraz łącznie na cisplatynę i gemcytabinę. Druga część pracy opierała się na syntezie serii strukturalnie zróżnicowanych izotiocyjanianów będących pochodnymi estrów aminokwasów oraz ocenie ich aktywności biologicznej wobec komórek linii raka pęcherza moczowego, opisanych przez Doktorantkę w pierwszej części pracy.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazały na zależność aktywności biologicznej od budowy strukturalnej izotiocyjanianów w oparciu o długość łańcucha alifatycznego i stopień rozgałęzienia łańcucha głównego estrów. Analiza uzyskanych wyników pozwoliła na selekcję odpowiedniego izotiocyjanianu wykorzystanego do dalszych badań, które skupiały się na ocenie parametrów życiowych komórek raka pęcherza moczowego, w tym ocenie potencjału przeciwnowotworowego wybranej substancji.

Rozprawa doktorska mgr Moniki Cuprych-Belter obejmuje 238 stron i podzielona jest na 9 rozdziałów: „Wstęp”, „Cel pracy”, „Materiały i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja wyników”, „Wnioski”, „Piśmiennictwo”, „Spis rycin i tabel”, kończąc na dorobku naukowym Pani Magister. Streszczenie przygotowane w języku polskim jak i angielskim zawierające syntetyczny opis założeń niniejszej pracy badawczej Doktorantka zamieściła na początku pracy doktorskiej. Istotnym elementem pierwszej części rozprawy doktorskiej jest również wykaz skrótów, który znacznie ułatwia zapoznanie się z treścią przedstawionego tekstu.

Poszczególne części dysertacji przygotowane zostały w sposób wymagany dla rozpraw doktorskich, a ich wzajemne proporcje są właściwe.

Wstęp jest obszerny, oparty o dobrze dobrane piśmiennictwo, uwzględniające najnowszą wiedzę w zakresie tematyki badawczej. Rozdział ten jest zrozumiały i daje dobre podstawy do lektury dalszych części rozprawy. Wskazuje także na dużą wiedzę Doktorantki w zakresie tematyki badawczej. Cele pracy zostały sformułowane jasno i precyzyjnie, a ich treść znajduje swoje odzwierciedlenie w problemie badawczym i stanowi spójną całość z wnioskami.

Rozprawa doktorska została dobrze zaplanowana, a dobrane przez Doktorantkę techniki badawcze opisane w rozdziale „Materiały i metody” pozwoliły na zrealizowanie przez Nią

celów badań. Materiałem badawczym były komórki 12 linii lekoopornych oraz trzech linii wrażliwych: UM-UC-3, RT-112 i TCC-SUP raka pęcherza moczowego. Wśród linii lekoopornych znajdowały się linie odporne raka pęcherza moczowego otrzymane w ramach współpracy, jak i wyprowadzone przez Doktorantkę z linii UM-UC-3, co zostało opisane w podrozdziale 3.2 zatytułowanym „Wyprowadzenie linii komórek opornych raka pęcherza moczowego na wybrane cytostatyki z linii komórkowej UM-UC-3”. Natomiast w podrozdziale 3.3 p.t. „Charakterystyka molekularna komórek linii lekoopornych raka pęcherza moczowego oraz linii wrażliwych (wyjściowych)” Doktorantka przedstawiła metody jakie zastosowała do ich charakterystyki molekularnej. Protokoły postępowania w wymienionych doświadczeniach nie budzą większych zastrzeżeń i pozostają zgodne ze współczesnym nurtem badawczym. Jednakże w tym miejscu chciałabym nadmienić, że w mojej opinii byłoby wskazane pełniejsze wyjaśnienie uwzględnienia przez Doktorantkę w dalszych badaniach linii: UM-UC-3, RT-112 i TCC-SUP, przy jednoczesnej eliminacji pozostałych opisanych przez Nią we wstępie do pracy (KU-19-19, HT-1376, 5637). Tym bardziej, że wyeliminowane linie pojawiają się w drugiej części badań opierającej się na ocenie aktywności izotiocyanianów wobec komórek nowotworowych pęcherza moczowego. Kolejną kwestią, którą chciałabym poruszyć jest sposób utrwalenia materiału do znakowania immunofluorescencyjnego tubuliny. Doktorantka w tym celu wykorzystwała wyłączenie 4% paraformaldehyd zgodnie z przyjętym protokołem. Jednak w celu zwiększenia efektywności obrazowania tej struktury, należałoby rozważyć także wykorzystanie buforu stabilizującego mikrotubule (MTSB) na etapie utrwalania komórek.

Rozdział „Materiały i Metody”, kończy się opisem analizy statystycznej wyników, opierającej się na zastosowaniu zróżnicowanych testów, przyporządkowanych odpowiednim metodom doświadczalnym.

Wyniki prowadzonych badań Doktorantka przedstawiła na 69 stronach i udokumentowała je 27 rycinami, w tym zdjęciami wykonanymi przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego, wykresami, a także 18 tabelami. Rozdział ten podzieliła na podrozdziały. Wszystkie przedstawione ryciny są przemyślane i pozwalają na przedstawienie wyników w bardzo przejrzystej formie, co znacznie ułatwiło zapoznanie się z efektami przeprowadzonych badań. W pierwszym podrozdziale Doktorantka przedstawiła otrzymane przez Nią cztery nowe lekooporne linie komórkowe raka pęcherza moczowego. W drugim opisała wyniki charakterystyki molekularnej lekoopornych oraz wrażliwych linii komórkowych raka pęcherza moczowego. Uzyskane wyniki wykazały, że komórki linii lekoopornych, wywodzące się z

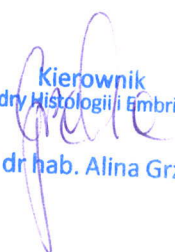
komórek różnych linii wyjściowych, mimo tego, że są odporne na ten sam cytostatyk, rozwinęły swoją oporność na drodze różnych mechanizmów. Skutkiem tego są zupełnie odmienne profile oporności krzyżowej komórek linii opornych raka pęcherza moczowego na inne związki. Pozostałe podrozdziały dotyczą zsyntetyzowanych 29 izotiocyjanianów będących pochodnymi estrów aminokwasów. Przeprowadzone badania dowiodły, że zsyntetyzowane związki wykazują aktywność antyproliferacyjną zarówno wobec komórek wyjściowych raka pęcherza moczowego, jak i komórek linii lekoopornych. Powodują m.in.: wzrost aktywności kaspazy 3 i 7, zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, obniżenie potencjału klonogenego komórek oraz zahamowanie polimeryzacji mikrotubul. Ponadto, wykazano, że struktura chemiczna izotiocyjanianów ma wpływ na ich aktywność biologiczną - im prostszy łańcuch boczny aminokwasu izotiocyjanianu oraz im krótszy łańcuch alifatyczny estru, tym związek wykazuje silniejszą aktywność antyproliferacyjną. W trakcie analizy rozdziału „Wyniki”, uwagę zwraca rycina 18, która przedstawia fotografie membran reprezentujących poziom białek ocenianych techniką western blot. Zgodnie z przedstawionymi w tej części wynikami, poziom analizowanych białek pochodzi z różnych membran, co może wiązać się chociażby ze zróżnicowanym nasyceniem tła membrany i wpływać na wynik pomiaru densytometrycznego. W tym przypadku należałoby wskazać metodologię oceny densytometrycznej, stosownie do sposobu przedstawienia wyników.

Otrzymane wyniki zostały omówione w rozdziale „Dyskusja” w oparciu o dostępne piśmiennictwo. Jest to rozdział obszerny, napisany rzeczowo i merytorycznie. W rozdziale tym mgr Monika Cuprych-Belter odniosła się do dostępnych w piśmiennictwie publikacji innych autorów, wykazując dużą kompetencję, zrozumienie przeprowadzonych badań, jak i krytyczną analizę własnych wyników w stosunku do innych badaczy. Doktorantka udowodniła, że potrafi ustosunkować się do wyników badań własnych w kontekście dobrze dobranego piśmiennictwa. Uważam, że osiągnęła ona zamierzone cele o czym świadczą cztery wnioski kończące rozprawę doktorską. Wnioski zostały jasno i logicznie sformułowane co więcej, odpowiadają postawionym celom pracy.

Rozdział „Piśmiennictwo” obejmuje 276 pozycji, są one dobrze dobrane i odpowiednio wykorzystane w rozprawie doktorskiej. Ponadto, większość cytowanych źródeł opublikowana została w ciągu ostatnich kilkunastu lat, co znacząco podnosi wartość i aktualność dyskusji nad zaprezentowanymi wynikami badań. Wątpliwość budzi jednak wykorzystanie przez Doktorantkę kilku niezweryfikowanych i ogólnie wskazanych internetowych źródeł informacji, takich jak choćby m.in. internetowa encyklopedia lub witryna [www.mp.pl](http://www.mp.pl).

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że uzyskane wyniki w dysertacji są spójne, ważne dla podjętej problematyki badawczej. Doktorantka udowodniła, że potrafi samodzielnie sformułować i rozwiązać problem naukowy, dobrze dobrać i opanować techniki badawcze, które posłużyły Jej do uzyskania wyników na dobrym poziomie. Pokazała także, że potrafi przeprowadzić dyskusję swoich wyników z wynikami innych grup badawczych, a więc udowodniła, że posiada predyspozycje do prowadzenia samodzielnych badań naukowych.

Rozprawa doktorska mgr Moniki Cuprych-Belter pt. „Synteza oraz badanie aktywności biologicznej izotiocyjanianów wobec linii komórkowych raka pęcherza moczowego” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. z 2021 r., poz. 478 ze zm.). W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu z prośbą o dopuszczenie mgr Moniki Cuprych-Belter do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na ilość przeprowadzonych badań, jakość wyników uzyskanych z wykorzystaniem interdyscyplinarnego zaplecza naukowego oraz dużą wartość merytoryczną pracy wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

  
Kierownik  
Katedry Histologii i Embriologii  
prof. dr hab. Alina Grzanka