



UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI



Łódź, 25.08.2017

Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek
Kierownik Zakładu i Katedry
Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Recenzja pracy doktorskiej
mgr Anna Czubatka-Bieńkowska

**„Analiza aktywności biologicznej funkcjonalizowanych siarką pochodnych
węglowodanów jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych”**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
dr hab. Tomasza Popławskiego , prof. nadzw. UŁ
w Katedrze Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego

Kancerogeneza to niezwykle skomplikowany i wieloczynnikowy proces, który może trwać latami. Według szacunków 80% przypadków nowotworzenia spowodowanych jest ingerencją szkodliwego czynnika zewnętrznego, promieniowania, wirusa, substancji chemicznych. Ryzyko zachorowania na nowotwór zwiększają określone predyspozycje genetyczne. Historia choroby w rodzinie nie przesądza o wystąpieniu nowotworu, w tym aspekcie dziedziczone są jedynie predyspozycje, które mogą być sprzyjające rozwojowi choroby. Tak więc w wyniku działania czynników zewnętrznych lub wewnętrznych rozpoczyna się proces kancerogenezy. Komórka może się obronić jeśli jest w stanie naprawić uszkodzony DNA lub doprowadzić do zaprogramowanej śmierci, czyli apoptozy. Badania molekularne określające proces kancerogenezy są jednak bardzo trudne, a rozwój choroby nowotworowej zależy od jej indywidualnego charakteru. Tym bardziej, strategie terapeutyczne, które powinny odpowiadać spersonalizowanemu klinicznie obrazowi choroby mnożą liczne rozwiązania których skuteczność jest wypadkową wielu

Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

Kierownik Zakładu i Katedry: Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek
tel. +48 42 272 56 96, e-mail: ireneusz.majsterek@umed.lodz.pl



UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI



czynników, takich jak wiek, płeć, przynależność etniczna, czas trwania oraz diagnozy, współwystępowanie innych chorób układowych oraz typ nowotworu, mięsaki, chłoniaki, białaczki, glejaki, czerniaki i inne.

Węglowodany i ich pochodne dzięki swoim właściwościom chemicznym i biologicznym stanowią interesującą grupę związków organicznych o dużym potencjale terapeutycznym. Spośród innych grup związków organicznych wyróżnia je przede wszystkim łatwość i różnorodność modyfikacji polegająca na przyłączaniu do części cukrowej innych węglowodanów i grup chemicznych o różnym charakterze. Największy potencjał terapeutyczny wykazują tiocukry ze względu na obecność siarki w swojej strukturze. Atom siarki w tiocukrach występuje jako heteroatom, w wiązaniu S-glikozydowym łączącym węglowodany i inne grupy chemiczne lub też jest jednym z elementów grup funkcyjnych. Zastąpienie atomu tlenu siarką zmienia właściwości biologiczne i fizykochemiczne tak zmodyfikowanych węglowodanów. Dlatego, działalność naukowa mgr Anny Czubańska-Bieńkowskiej zasługuje na wyjątkowe uznanie, ponieważ zajęła się dogłębnym poznaniem możliwości zastosowania funkcjonalizowanych pochodnych węglowodanów w terapii przeciwnowotworowej. Badania aktywności przeciwnowotworowej w warunkach *in vitro* nowo zaprojektowanych i zsyntetyzowanych funkcjonalizowanych siarką węglowodanów i ich pochodnych prowadzono we współpracy z Katedrą Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Wilkes, USA. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej były finansowane w ramach Grantu Narodowego Centrum Nauki PRELUDIUM nr DEC-2014/15/N/NZ7/02949 „Właściwości przeciwnowotworowe glikozyłowanych tiosemikarbazydów”, Grantu Narodowego Centrum Nauki OPUS nr 2011/01/B/NZ4/03391 „Modulacja przez tiocukry naprawy DNA indukowanej lekami używanymi w terapii nowotworów” oraz dotacji celowej na finansowanie działalności polegającej na prowadzeniu badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich przyznana przez Dziekana Wydziału BiOŚ UŁ w roku 2014, 2015 i 2016. Ponadto, badania realizowane były w ramach projektu „Doktoranci – Regionalna Inwestycja w Młodych Naukowców nauk przyrodniczych i technologicznych – Akronim – D-RIM BIO” realizowanego przez Biuro Programów

Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

Kierownik Zakładu i Katedry: Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek
tel. +48 42 272 56 96, e-mail: ireneusz.majsterek@umed.lodz.pl



Badawczych i Strukturalnych UŁ w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Poddziałania 8.2.1.

W swoich badaniach Doktorantka zastosowała szereg metod nowoczesnej biologii molekularnej, w tym mikroplótkowe analizy z przeciwciałami, metody cytometryczne, enzymatyczny test kometowy, pułapki spinowe, TUNEL, technikę qPCR-Taqman, dzięki czemu doprowadziły one do ważnych wniosków mogących mieć swoje zastosowanie w praktyce klinicznej. W tym celu zaplanowano realizację następujących problemów badawczych: 1) określenie cytotoksycznych i genotoksycznych właściwości badanych związków w komórkach; 2) określenie zdolności badanych związków do bezpośrednich interakcji z DNA; 3) ocenę zdolności badanych związków do indukcji procesu apoptozy lub nekrozy w komórkach nowotworowych; 4) analizę zmian w ekspresji kluczowych genów kodujących białka związane z odpowiedzią komórek na badane związki; 5) analizę stresu oksydacyjnego indukowanego przez badane związki w komórkach nowotworowych; 6) ocenę zdolności badanych związków do modulacji procesów naprawy DNA.

Przechodząc do merytorycznej oceny pracy mgr Anny Czubatka-Bieńkowskiej należy podkreślić, iż podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora przez Panią Magister jest monograficzny cykl publikacji pt.: „Analiza aktywności biologicznej funkcjonalizowanych siarką pochodnych węglowodanów jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych”, którego tematyka jest ściśle związana z zainteresowaniami naukowymi Doktorantki. W skład cyklu wchodzi 3 publikacje o łącznym IF wg roku publikacji 10,505 oraz punktacji MNiSW 105 pkt. Chciałbym jednoznacznie stwierdzić, że przedstawiony cykl prac zawiera kompleksową ocenę właściwości przeciwnowotworowych szeregu wybranych funkcjonalizowanych siarką węglowodanów i ich pochodnych z uwzględnieniem ich modyfikacji chemicznych oraz specyfiki oddziaływania na wybrane linie komórek nowotworowych. Badania *in vitro* przeprowadzono na hodowlach komórek linii: raka szyjki macicy HeLa, niedrobnokomórkowego raka płuc A549, raka jelita grubego LoVo, raka piersi MCF7, raka jajnika A2780, glejaka MO59J i przewlekłej białaczce szpikowej K562. W pracy oceniano aktywność biologiczną 12 funkcjonalizowanych siarką węglowodanów i ich pochodnych funkcjonalnie podzielonych na 5 grup: mono-tiocukry, w których siarka występuje jako heteroatom, związek z siarką

Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

Kierownik Zakładu i Katedry: Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek
tel. +48 42 272 56 96, e-mail: ireneusz.majsterek@umed.lodz.pl

w łańcuchu bocznym w grupie metanosulfonamidowej, S-glikozylowany dwucukrem anhydrocukier, S-glikozylowane laktozą, arabinozą, galaktozą i glukozą tiosemikarbazydy oraz anhydrocukry. Uzyskane w pracy wyniki potwierdziły potencjał przeciwnowotworowy funkcjonalizowanych siarką węglowodanów i ich pochodnych oraz wskazały kierunki przyszłych modyfikacji. Wykazano, że najbardziej wartościową grupą związków są mono-tiocukry. Związki te wykazywały właściwości cytotoksyczne oraz pro-oksydacyjne względem komórek nowotworowych, których konsekwencją były indukowane uszkodzenia DNA. Ponadto, wykazano, że mechanizm indukcji stresu oksydacyjnego przez badane mono-tiocukry związany był z indukcją ekspresji genu NOX5 kodującego oksydazę 5 NADPH.

Bardzo interesujące właściwości wykazywała pochodna węglowodanu z motywem metanosulfonamidowym, 1,5-anhydro-6-deoxy-sulfamido-D-glucitol. Doktorantka sugeruje, że związek ten nie działa cytotoksycznie na komórki nowotworowe i wykazuje znacznie mniejsze właściwości pro-oksydacyjne niż mono-tiocukry, a jego głównym efektem działania jest indukcja uszkodzeń DNA w komórkach nowotworowych wynikająca z bezpośredniej interakcji z DNA, preferencyjnie z parami A-T, przez większy rowek DNA. Bardzo proszę Doktorantkę o rozwinięcie uzasadnienia, które wskazuje na genotoksyczne właściwości badanego związku, przy jednoczesnym braku aktywności cytotoksycznych dla komórek nowotworowych, jaki specyficzny charakter mają uszkodzenia DNA, zmiany konformacyjne, modyfikacje zasad, zmiany ramki odczytu i inne?

Uszkodzenia DNA indukowały też S-glikozylowane tiosemikarbazydy zależnie od struktury S-glikozylowanego tiosemikarbazydu i były najsilniejsze gdy część cukrową stanowił disacharyd połączony wiązaniem S-glikozydowym z rdzeniem anhydrocukier-tiosemikarbazyd. Doktorantka sugeruje, że ta grupa pochodnych indukuje uszkodzenia DNA na drodze nie związanej z indukcją stresu oksydacyjnego, czy też apoptozy. Prawdopodobnym mechanizmem działania jest hamowanie składania białek w komórkach nowotworowych inkubowanych z badanymi związkami. Bardzo proszę Doktorantkę o rozwinięcie uzasadnienia, które wskazuje na indukcję szlaku UPR (*Unfolded Protein Responce*) w mechanizmie zależnym od stresu retikulum endoplazmatycznego-ER, jakie



UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI



moga być konsekwencje na poziomie komórkowym z uwzględnieniem translacji białek oraz apoptozy?

W odniesieniu do uzyskanych wyników zrealizowana praca doktorska wpisuje się w ogólnoswiatowy trend poszukiwania nowych związków o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej oraz niskiej cytotoksyczności względem komórek prawidłowych, co ma na celu wyeliminowanie efektów ubocznych stosowanej chemioterapii. Choroby nowotworowe, pomimo wielu prób wprowadzenia nowych spersonalizowanych i skutecznych terapii obejmujących stosowanie inhibitorów: angiogenezy, naprawy DNA, cyklu komórkowego, receptorów hormonalnych oraz czynników wzrostu stanowią wciąż, po chorobach układu krążenia, drugą przyczynę zgonów. Jedną z przyczyn niskiej skuteczności terapii przeciwnowotworowych leży u podstaw wieloczynnikowego mechanizmu transformacji nowotworowej, co ogranicza możliwości stosowania uniwersalnych protokołów leczniczych. Dlatego, w oparciu o ostatecznie potwierdzoną diagnostykę uwzględniającą cytologiczne i fizjologiczne wyznaczniki różnorodności nowotworów kluczowe jest określenie najbardziej efektywnej strategii leczenia. Bardzo proszę Doktorantkę o rozwinięcie uzasadnienia, które potwierdza skuteczność i/lub specyficzność stosowanych w pracy związków do leczenia badanych nowotworów: raka szyjki macicy, niedrobnokomórkowego raka płuc, raka jelita grubego, raka piersi, raka jajnika, glejaka i przewlekłej białaczki szpikowej?

W podsumowaniu oceny merytorycznej należy stwierdzić, że uzyskane wyniki są kluczowe dla identyfikacji mechanizmów działania tiocukrów oraz ich potencjalnych możliwości wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej. Wyniki pracy doktorskiej stanowią tym samym podstawę chemii medycznej tiocukrów, co w przyszłości może przyczynić się do opracowania nowych pochodnych stosowanych jako leki przeciwnowotworowe. Należy podkreślić, że tematyka badań jest unikalna w skali światowej, a zrozumienie mechanizmu działania funkcjonalizowanych siarką węglowodanów i ich pochodnych ma zasadnicze znaczenie dla dalszego rozwoju tego kierunku badań. Jest wysoce prawdopodobne, że zapoczątkowane w pracy nowatorskie badania mogą stanowić punkt wyjścia do badań *in vivo* oraz badań klinicznych.

Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

Kierownik Zakładu i Katedry: Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek
tel. +48 42 272 56 96, e-mail: ireneusz.majsterek@umed.lodz.pl



Poddając ocenie rozprawę doktorską mgr Anny Czubatka-Bieńkowskiej należy ze szczególnym uwzględnieniem podkreślić bardzo wartościowy tematycznie całkowity dorobek publikacyjny, mierzony wartościami naukowymi IF 28,229 oraz 305 pkt. MNiSW, który odzwierciedla bardzo wysoką aktywność oraz dojrzałość zawodową Doktorantki. Potwierdza to również udział w 28 krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych oraz odbyte staże zagraniczne: Kurs szkoleniowy TransFormation.doc realizowany w ramach projektu systemowego Ministra Nauki Szkolnictwa Wyższego pt. „Wsparcie systemu zarządzania badaniami naukowymi i ich wynikami”; Uniwersytet w Lund, Szwecja (18.10-31.10.2015); Staż naukowy w Sveriges lantbruksuniversitet/Swedish University of Agricultural Sciences, Division of Precision Agriculture and Pedometrics, Department of Soil and Environment w Skarze w Szwecji; prace w projekcie "BioSoM" - Biological Soil Mapping (02.05-02.07.2015 r.); Staż naukowy w Sveriges lantbruksuniversitet/Swedish University of Agricultural Sciences, Division of Precision Agriculture and Pedometrics, Department of Soil and Environment w Skarze w Szwecji (28.03-28.04.2014).

Dlatego chciałbym podkreślić, że dysertacja Pani mgr Anny Czubatka-Bieńkowskiej stanowi przykład doskonałego modelu współpracy Pana Prof. Tomasza Popławskiego oraz Doktorantki, która korzystając z wieloletniego doświadczenia oraz bogatego warsztatu naukowego swojego Promotora osiągnęła wymierne efekty, które z całą pewnością określić można miarą sukcesu. Potwierdzeniem tego sukcesu są wyniki uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej, które opublikowane zostały w renomowanych czasopismach naukowym z listy JCR. Tym bardziej, potwierdza to uzasadniona decyzja promotora Pana Prof. Tomasza Popławskiego, który zdecydował się na złożenie pracy doktorskiej w formie monotematycznej „zszywki” z cyklu recenzowanych publikacji. Dodatkowym, bardzo ważnym wyznacznikiem wartości uzyskanych wyników i podjętej tematyki pracy doktorskiej jest ich finansowanie z grantów NCN „Preludium” oraz „OPUS” realizowanych przez Doktorantkę pod opieką kierownika tego autorskiego projektu Profesora Tomasza Popławskiego.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach

Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

Kierownik Zakładu i Katedry: Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek
tel. +48 42 272 56 96, e-mail: ireneusz.majsterek@umed.lodz.pl



UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI



naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Z przyjemnością przedkładam do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr Anny Czubatka-Bieńkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz ze względu na wysoki poziom naukowy tej dysertacji, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej.

Z poważaniem,

KIEROWNIK
Międzywydziałowej Katedry
Chemii i Biochemii Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Ireneusz Majsterek
prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek

Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

Kierownik Zakładu i Katedry: Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek
tel. +48 42 272 56 96, e-mail: ireneusz.majsterek@umed.lodz.pl