

## **Uniwersytet Medyczny Katedra i Zakład Biochemii Medycznej w Łodzi**

Prof. dr hab. Janusz Szemraj  
ul. Mazowiecka 6/8  
92-215 Łódź  
tel/fax: 042678-24-65  
e mail: Janusz.szemraj@umed.lodz.pl

Łódź, 06.09.2017r.

### **Recenzja pracy doktorskiej**

pt. „Analiza aktywności biologicznej funkcjonalizowanych siarką pochodnych węglowodanów jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych” wykonaną przez mgr Annę Czubatkę-Bieńkowską w Katedrze Genetyki Molekularnej Uniwersytetu pod kierunkiem dr hab. prof. nadzw. UŁ Tomasza Popławskiego w ramach Stacjonarnych Studiów Doktoranckich Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki Molekularnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska.

Nowotwory stanowią jeden z głównych problemów zdrowotnych, są bardzo częstą przyczyną zgonów w Polsce. W terapii nowotworów ważna jest wczesna diagnoza, profilaktyka, a w przypadku zachorowania trwałe wyleczenie. Pomimo rosnącej ilości trwałych wyleczeń w przypadku niektórych nowotworów, przy rosnącej zapadalności ciągle istnieje potrzeba poszukiwania nowych skutecznych leków bez ryzyka nawrotu choroby. Chemioterapia odgrywa ważną rolę w leczeniu nowotworów. Wśród wielu stosowanych leków spotyka się też mało skuteczne, o działaniach niepożądanych dlatego też badania nad poszukiwaniem nowych leków przeciwnowotworowych są wyzwaniem dla naukowców. Jedną z grup związków organicznych które próbuje się wykorzystać w leczeniu różnych jednostek chorobowych w tym choroby nowotworowej są węglowodany. Syntetyzuje się i analizuje właściwości biologiczne pochodnych węglowodanowych modyfikowanych przez dołączenie różnych grup chemicznych. Jedną z takich grup pochodnych są tiocukry posiadając w swoich cząsteczkach siarkę w miejscu tlenu stają się niewrażliwe na

enzymatyczną i chemiczną degradację. Zespół prof. Tomasza Popławskiego od lat analizuje mechanizm reakcji i właściwości farmakologiczne tiocukrów. Są to badania unikalne pozwalające na zbadanie mechanizmu działania funkcjonalizowanych siarką węglowodanów. Analizowane związki posiadają potencjał przeciwnowotworowy i niską cytotoksyczność względem komórek prawidłowych obniżając przeżywalność komórek nowotworowych oraz indukując uszkodzenia DNA, nie wykazując wpływu na komórki prawidłowe.

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej Doktorantka pojęła próbę analizy właściwości biologicznych - oceny aktywności przeciwnowotworowej w warunkach *in vitro*, mechanizmów działania nowych funkcjonalizowanych siarką węglowodanów i ich pochodnych na wybranych liniach komórek nowotworowych. Prezentowane w pracy doktorskiej wyniki powstały w wyniku długoletniej współpracy Promotora z Katedrą Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu w Wilkes, USA.

Pracę doktorską mgr Anny Czubatki-Bieńkowskiej stanowi cykl bardzo dobrych publikacji 4 publikacji; w których Doktorantka jest pierwszym autorem w trzech z nich. Łączna suma punktów MNiSW wynosi 105; impakt factor 10,505. Uzyskane w trakcie realizacji doktoratu wyniki mgr Anna Czubatka-Bieńkowska zaprezentowała w postaci 26 doniesień zjazdowych.

Przeprowadzone badania oparto na hipotezie, że zsyntetyzowane, modyfikowane siarkowe pochodne węglowodanów mogą indukować szereg zmian na poziomie molekularnym takich jak: apoptozę, nekrozę komórek nowotworowych, generować reaktywne formy tlenu, azotu prowadzące do uszkodzeń w DNA, zmian w ekspresji szeregu genów których produkty białkowe są odpowiedzialne w odpowiedzi komórek na związki toksyczne.

Postawioną hipotezę Doktorantka postanowiła potwierdzić analizując geno i cytotoksyczność badanych związków w komórkach, ich oddziaływania z DNA, indukcję apoptozy, nekrozy w komórkach nowotworowych, tworzenie reaktywnych form tlenu, azotu, czy modulacji procesów naprawy DNA.

Badania 12 wybranych związków podzielonych na pięć grup przeprowadzone zostały na 6 różnych dobrze dobranych liniach komórkowych raka macicy, niedrobnokomórkowego raka płuc raka piersi, jajnika, jelita grubego, glejaka czy przewlekłej białaczki szpikowej.

Metody użyte oparte zostały o nowoczesne, trudne techniki eksperymentalne biologii molekularnej, tj.: technikę qPCR z wykorzystaniem sond Taqman, do oceny ekspresji badanych genów, metody spektrofluorymetryczne, kolorymetryczne, cytometryczne, test kometkowy (ocena cytotoksyczności, genotoksyczności, właściwości pro-apoptotycznych,



indukcji nekrozy, pro-oksydacyjne badanych związków) zostały prawidłowo dobrane do rozwiązywania podjętych zadań.

Wyniki zaprezentowane w przedstawionych do oceny pracach potwierdziły aktywność przeciwnowotworową niektórych funkcjonalizowanych siarką węglowodanów. Na szczególną uwagę zasługują mono-tiocukry posiadające aktywność cytotoksyczną, prooksydacyjną nie związaną z apoptozą a wzrostem poziomu ekspresji genu *NOX5* kodującego oksydazę NADPH prowadzącą do powstawania RFT. Inna pochodna węglowodanów z motywem metanosulfonamidowym -1,5-anhydro-6-deoxy-sulfamido-D-glucitol nie wykazywała aktywności cytotoksycznej mniejszą w porównaniu z mono-tiocukrami w stosunku do komórek nowotworowych, natomiast stymulowała powstawanie uszkodzeń w DNA częściowo wiążąc się z DNA. Czy tego rodzaju interakcje z DNA dotyczą tylko komórek nowotworowych?.

Inne pochodne monosacharydów S-glikozylowane tiosemikarbazydy przede wszystkim disacharyd połączony wiązaniem S-glikozydowym semikarbazydu również generowały uszkodzenia w DNA w zupełnie inny sposób nie związany z apoptozą czy stresem oksydacyjnym hamując składanie białek indukując ekspresję białek szoku cieplnego czy stresu retikulum endoplazmatycznego.

Podsumowując otrzymane wyniki mgr Anna Czubatka-Bieńkowska wykazała brak aktywności cyto i genotoksycznej anhydrocukrów w komórkach nowotworowych. Mono-tiocukry stymulując ekspresję genu *NOX5* indukują stres oksydacyjny. Związek z motywem metanosulfoamidowym podobnie jak S-glikozylowane tiosemikarbazydy indukowały uszkodzenia w DNA.

Na podstawie uzyskanych wyników mgr Anna Czubatka-Bieńkowska sformułowała 5 końcowych wniosków, uogólniające zreferowane i przedyskutowane dane.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka przeprowadziła badania w ramach pracy doktorskiej w oparciu o przyznane fundusze grantu Preludium NCN którego była kierownikiem, grantu Opus (kierownik prof. Tomasz Popławski), dotacji celowej przyznanej przez Dziekana Wydziału BiOŚ UŁ, Projektu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Poddziałania 8.2.1. Dodatkowo przedstawione wyniki badań zrealizowano w ramach współpracy z katedrą Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Wilkes, USA. Podczas realizacji doktoratu mgr Anna Czubatka-Bieńkowska odbyła trzy staże zagraniczne w dwóch ośrodkach naukowych Szwecji; Lund i Skarze.

Jako Recenzent chciałbym Doktorance zadać pytanie czy tiocukry są stosowane w leczeniu innych niż nowotworowe chorób człowieka w tym również o podłożu bakteryjnym,

wirusowym. Jaka grupa pochodnych węglowodanów ma największe szanse być wykorzystana w medycynie jako potencjalne leki przeciwnowotworowe.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem uważam, że recenzowana rozprawa doktorska Anny Czubatki-Bieńkowskiej pod każdym względem spełnia wymogi stawiane takim dysertacjom. Stanowi ona samodzielne i oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wnosi nowe, ważne poznawczo informacje min. o mechanizmie działania tiocukrów, możliwościach potencjalnego wykorzystania nowo syntetyzowanych tiocukrów o właściwościach przeciwnowotworowych w terapii przeciwnowotworowej. Niepodważalne znaczenie dla wartości pracy – którą pod względem merytorycznym oceniam bardzo wysoko miała by kontynuacja dalszych badań *in vivo*.

W podsumowaniu uważam, że praca doktorska mgr inż. Anny Czubatki-Bieńkowskiej zatytułowana „Analiza aktywności biologicznej funkcjonalizowanych siarką pochodnych węglowodanów jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych” odpowiada warunkom określonym w art. 11 ustawy o tytułach i stopniach naukowych (Dz. Ust. Nr 65 /90, póż. 386) dla rozprawy na stopień doktora, ze względu na walor aplikacyjny, oraz nowatorski zwracam się z wnioskiem do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Annę Czubatkę-Bieńkowską do dalszych etapów przewodu doktorskiego jednocześnie wnioskując o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą Rektorską.

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Biochemii Medycznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
  
Prof. dr hab. n. med. Janusz Szemraj