



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD BIOLOGII KOMÓRKI

KIEROWNIK ZAKŁADU

PROF. DR HAB. ZBIGNIEW MADEJA

Ocena rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Filipa Borysa pt. „Synteza i badanie właściwości spektroskopowych i biologicznych pochodnych stilbenu i izosterów stilbenu-potencjalnych leków w terapii nowotworów”.

Zdolność do kontrolowanego wzrostu i podziału komórek jest podstawą prawidłowego funkcjonowania organizmów wielokomórkowych a jego zaburzenie leży u podstaw rozwoju nowotworów. W procesie proliferacji komórek nowotworowych szczególnie istotną rolę odgrywa cytoskielet mikrotubularny, który zapewnia sprawną segregację materiału genetycznego podczas mitozy. Mikrotubule, jako dynamiczne polimery tubuliny, nie tylko odpowiadają za utrzymanie struktury komórki czy transport organelli, lecz przede wszystkim stanowią podstawowy element wrzeciona podziałowego. Z tego względu od wielu lat stanowią one przedmiot intensywnych badań jako cel terapeutyczny w onkologii. Klasyczne inhibitory polimeryzacji mikrotubul wykazały skuteczność w hamowaniu podziału komórek nowotworowych, jednak ich stosowanie wiąże się z poważnymi skutkami ubocznymi wynikającymi z toksyczności wobec komórek prawidłowych. W tym kontekście pojawia się potrzeba opracowania nowych strategii, które pozwoliłyby na bardziej selektywne i kontrolowane oddziaływanie terapeutyczne. Jedną z obiecujących koncepcji są światłoczułe przełączniki molekularne – związki, których aktywność biologiczna może być regulowana z użyciem światła. Takie podejście stwarza potencjalną możliwość lokalnej aktywacji substancji przeciwnowotworowej jedynie w obrębie zmienionej chorobowo tkanki, ograniczając tym samym działania niepożądane w zdrowych komórkach.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pan mgr. inż. Filipa Borysa wpisuje się w ten nowoczesny i dynamicznie rozwijający się nurt badań nad precyzyjną modulacją aktywności terapeutycznej związków chemicznych oddziałujących na mikrotubule. Praca ta została zrealizowana pod opieką naukową dwóch doświadczonych badaczek: dr hab. inż., prof. uczelni Hanny Krawczyk oraz dr hab. Ewy Joachimiak. Stanowi ona efekt kilkuletnich, systematycznych badań i łączy w sobie zagadnienia z pogranicza chemii organicznej, biologii molekularnej i farmakologii, co czyni ją szczególnie cenną z perspektywy badań interdyscyplinarnych.

Od strony formalnej przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi cykl dwóch opublikowanych, powiązanych tematycznie oryginalnych prac badawczych oraz dwóch publikacji przeglądowych, które stanowią spójne i merytorycznie uzasadnione wprowadzenie do problematyki poruszanej w części eksperymentalnej. Całość została

uzupełniona obszernym wstępem i komentarzem autorskim. Taka konstrukcja rozprawy doktorskiej jest w pełni zgodna z art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”, który dopuszcza możliwość przygotowania pracy doktorskiej w formule cyklu publikacji.

Forma ta, mimo swojej rosnącej popularności, wciąż bywa przedmiotem dyskusji, zwłaszcza w kontekście trudności z jednoznacznym określeniem indywidualnego wkładu doktoranta w prace wieloautorskie. Należy zaznaczyć, że w materiałach dołączonych do rozprawy nie znalazły się odrębne oświadczenia współautorów dotyczące ich udziału w poszczególnych publikacjach, co bywa wymagane w niektórych jednostkach naukowych jako element dokumentacji. Jednak w przypadku pracy mgr inż. Filipa Borysa brak ten nie stanowi istotnej przeszkody w ocenie wiodącej roli doktoranta. We wszystkich czterech publikacjach figuruje on jako pierwszy autor, co w naukach eksperymentalnych jest powszechnie uznawane za jednoznaczny wskaźnik głównego autorstwa. Co więcej, w dwóch spośród czterech prac doktorant występuje również jako autor korespondencyjny, co dodatkowo potwierdza jego znaczący udział zarówno w opracowaniu koncepcji badań, jak i w przygotowaniu manuskryptów.

Spójność tematyczna całego cyklu oraz logiczna ciągłość prowadzonych badań wyraźnie wskazują na konsekwentną realizację jednolitego planu badawczego, którego autorem i głównym wykonawcą był doktorant. W skład cyklu wchodzi przegląd literatury poświęcony mikrotubulom oraz klasycznym i nowym podejściom do ich modulacji, a także publikacje opisujące projektowanie, syntezę i ocenę aktywności biologicznej nowych związków oddziałujących z tubuliną – zarówno klasycznych inhibitorów, jak i potencjalnych światłoczułych przełączników molekularnych. Całość tworzy spójną, dobrze przemyślaną i oryginalną koncepcję badawczą, w której poszczególne elementy wyraźnie się uzupełniają.

Reasumując, oceniana rozprawa spełnia wszystkie wymogi formalne, a jej konstrukcja i jakość merytoryczna mogą służyć jako wzorcowy przykład pracy doktorskiej przygotowanej w formule cyklu publikacji. Pomimo braku dołączonych formalnych oświadczeń współautorów, dostępne dane – w tym pozycja doktoranta jako pierwszego autora oraz autora korespondencyjnego, jak również spójność i ciągłość badań – pozwalają jednoznacznie wnioskować o jego wiodącym i samodzielny udział w realizacji projektu badawczego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera zatem bogaty komentarz autorski, który liczy 50 stron maszynopisu oraz cztery opublikowane prace naukowe, w tym dwie oryginalne prace doświadczalne oraz dwie prace przeglądowe. Komentarz autorski obejmuje streszczenia w języku polskim i angielskim, życiorys naukowy doktoranta, wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy, a także obszerny wstęp, w którym autor w sposób przystępny i szczegółowy omawia budowę mikrotubul, ich funkcje w komórkach nowotworowych, mechanizmy regulujące ich dynamikę oraz możliwości modulacji tych struktur z użyciem światłoczułych przełączników molekularnych. Dane przedstawione w tej części opracowania stanowią skrócone omówienie treści dwóch prac przeglądowych wchodzących w skład pracy doktorskiej. Kluczowym elementem pracy jest Autoreferat, w którym doktorant przedstawia cele i zakres badań, omawia stosowane metody eksperymentalne, prezentuje uzyskane wyniki oraz formułuje wnioski. Praca napisana jest przejrzysto i logicznie; poszczególne jej części prowadzą czytelnika w

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII UJ

sposób spójny od podstaw teoretycznych do analizy własnych wyników badawczych i ich znaczenia w kontekście terapii przeciwnowotworowej.

W części eksperymentalnej rozprawy doktorant zastosował szeroki zakres metod badawczych, właściwych dla współczesnych badań nad aktywnością przeciwnowotworową związków chemicznych. Obejmowały one zarówno syntezę oraz analizę strukturalną nowych pochodnych stilbenu i kolchicyny, jak i ich charakterystykę biologiczną. W pracy wykorzystano metody klasycznej i fotoindukowanej oceny cytotoksyczności na wybranych liniach komórkowych, mikroskopię fluorescencyjną do wizualizacji zaburzeń w organizacji mikrotubul, a także modelowanie molekularne oraz dokowanie *in silico*, pozwalające na ocenę potencjalnych interakcji ligandów z domeną kolchicynową tubuliny. Szczególną wartość poznawczą mają zastosowane podejścia fotofarmakologiczne, umożliwiające kontrolę aktywności związków w sposób zależny od światła — co znajduje się na pograniczu nowoczesnej biologii komórki i chemii supramolekularnej. Przedstawiony wybór metod jest adekwatny do postawionych hipotez badawczych, a ich prawidłowe zastosowanie pozwoliło na uzyskanie danych o wysokiej jakości i wiarygodności. Pewne zastrzeżenia budzi jedynie ograniczenie się przez Autora w badaniach oceniających liczbę żywych komórek jedynie do testu MTT. Do tego zagadnienia powróć w dalszej części recenzji.

W rozprawie doktorskiej zaprezentowano kompleksowe badania nad nowymi związkami chemicznymi celującymi w mikrotubule – kluczowy element cytoszkieletu komórkowego, który stanowi ważny cel w terapii przeciwnowotworowej. Prace eksperymentalne skupiły się na dwóch grupach związków: klasycznych inhibitorach mikrotubul (pochodnych stilbenu i dibenzo[b,f]oksepiny) oraz nowatorskich, światłoczułych przełącznikach molekularnych opartych na strukturze kolchicyny i fragmentach azobenzenu.

W pierwszym etapie badań zsyntetyzowano 28 związków (9 pochodnych stilbenu i 19 dibenzo[b,f]oksepiny), które następnie poddano ocenie aktywności przeciwnowotworowej wobec komórek nowotworowych (HCT116, MCF-7) oraz komórek prawidłowych (HEK293, HDF-A). Uzyskane wyniki wykazały, że pochodne stilbenu charakteryzowały się wyższą cytotoksycznością i lepszym indeksem selektywności w porównaniu do pochodnych dibenzo[b,f]oksepiny. Najbardziej aktywne związki to stilbeny 1a, 1c, 1d i 1i oraz dibenzo[b,f]oksepiny 2i, 2j i 3h. Badania dokowania molekularnego oraz analizy cytoszkieletu mikrotubularnego metodą immunofluorescencji potwierdziły, że mechanizm działania tych związków polegał na oddziaływaniu z tubuliną i zaburzaniu organizacji mikrotubul.

W drugim etapie zaprojektowano i zsyntetyzowano 12 światłoczułych pochodnych kolchicyny, które dzięki zastosowaniu fragmentu azobenzenu mogą ulegać kontrolowanej fotoizomeryzacji pod wpływem światła widzialnego. Przełączniki te stanowią nową klasę związków fotofarmakologicznych, umożliwiających przestrzenno-czasową kontrolę działania przeciwnowotworowego. Dla związku wiodącego (o-8d, znanego też jako o-AzoCol26DF) wykazano istotny wzrost cytotoksyczności po naświetlaniu światłem

zielonym ($\lambda = 535 \text{ nm}$), co odpowiadało obecności aktywnego izomeru Z. Równocześnie potwierdzono zdolność tego związku do hamowania polimeryzacji oczyszczonej tubuliny oraz dezorganizacji mikrotubul w komórkach nowotworowych.

Przedstawione wyniki są wartościowe i nowatorskie. Z jednej strony udokumentowano wysoką aktywność biologiczną wybranych klasycznych inhibitorów mikrotubul, z drugiej zaproponowano nową strategię regulacji dynamiki mikrotubul z wykorzystaniem światła widzialnego. Oba podejścia tworzą solidną podstawę do dalszych badań nad selektywnymi i kontrolowanymi w czasie lekami przeciwnowotworowymi nowej generacji.

Lektura wyników prezentowanych w ocenianej pracy była bardzo interesująca i nasunęła również kilka pytań:

1/ Autor zdecydował się oprzeć ocenę aktywności przeciwnowotworowej badanych związków na teście MTT. Rzeczywiście, test ten jest szeroko stosowany i rekomendowany przez niektóre organizacje (np. OECD). Warto jednak zauważyć, że MTT mierzy aktywność mitochondrialnej dehydrogenazy w żywych komórkach, co odzwierciedla ogólną aktywność metaboliczną, ale nie pozwala jednoznacznie odróżnić efektów cytotoksycznych (związanych z eliminacją komórek) od cytostatycznych (wynikających z zahamowania proliferacji). W szczególności, test MTT nie pozwala na precyzyjne określenie procentu żywych komórek w populacji ani na jednoznaczne rozróżnienie, czy spadek sygnału wynika z mniejszej liczby komórek (spowodowanej albo zahamowaniem proliferacji albo działaniem cytotoksycznym), ich mniejszej aktywności metabolicznej czy bezpośredniego wpływu testowanego związku na mitochondria. Czy Autor rozważał zastosowanie metod uzupełniających – np. analizy integralności błony komórkowej (np. z użyciem jodku propidyny) lub bezpośredniego liczenia komórek – które mogłyby lepiej scharakteryzować mechanizm działania badanych substancji i pozwolić na rozróżnienie między działaniem cytotoksycznym a cytostatycznym?

2/ Moje kolejne pytanie dotyczy doboru modelu komórkowego. Jednym z istotnych celów pracy było opracowanie inhibitorów mikrotubul aktywowanych przez światło widzialne, co miało umożliwić ograniczenie ich działania do miejsc naświetlanych – a więc bezpośrednio do guza – i tym samym zmniejszyć działania niepożądane terapii. Tego typu podejście przywodzi na myśl strategię znaną z terapii fotodynamicznej, skutecznej zwłaszcza w przypadku zmian zlokalizowanych powierzchownie (np. w obrębie skóry, jamy ustnej, przełyku). Z tego względu chciałbym zapytać, dlaczego do badań *in vitro* wybrano akurat komórki raka piersi (MCF-7) oraz raka okrężnicy (HCT116), czyli nowotworów zlokalizowanych raczej w głębszych tkankach i słabiej dostępnych dla światła? Czy Autor rozważał zastosowanie modeli komórkowych pochodzących z guzów powierzchniowych, które lepiej oddawałyby kliniczny kontekst terapii światło-aktywowanej?

Na koniec chciałbym zwrócić uwagę na kilka mniej istotnych kwestii redakcyjnych i drobnych nieścisłości.

- Na stronie 17 w części wprowadzającej czytamy: „*W wyniku tego procesu powstaje mikrotubula budową przypominająca pusty w środku cylinder, której długość może sięgać kilku mikrometrów.*” Wydaje się, że jest to lekkie niedoszacowanie – mikrotubule mogą osiągać znacznie większe długości, nawet rzędu dziesiątek mikrometrów, szczególnie w komórkach o silnie wydłużonej strukturze.
- Na stronach 42–43 znajduje się zdanie: „*Jako, że syntezowane pochodne kolchicyny miały zostać zastosowane w badaniach biologicznych, sprawdzona została ich stabilność w warunkach zbliżonych do warunków obecnych w hodowlach komórkowych (pożywka o wysokiej zawartości glukozy, 4 mM stężenie L-glutaminy, 10% dodatek DMSO, naświetlanie badanego roztworu impulsami światła niebieskiego ($\lambda = 430\text{ nm}$) lub zielonego ($\lambda = 535\text{ nm}$) o czasie trwania 500 ms co 15 sekund przez 48 godzin).*”
Czy rzeczywiście w opisanych warunkach hodowano komórki w obecności 10% DMSO? Wydaje się to mało prawdopodobne, biorąc pod uwagę toksyczność takiego stężenia. Być może chodziło jedynie o warunki testu stabilności w roztworze? Wymaga to doprecyzowania.
- Uwagę zwraca także podpis pod ryciną 19 na stronie 45 – wygląda na to, że kolejność rycin została pomyłona.
- Ponadto dużym utrudnieniem dla czytelnika jest bardzo mała czcionka na wydruku, szczególnie dotyczy to załączonych prac, utrudniającą zarówno czytanie jak i analizę zdjęć mikroskopowych. Niemniej nie wykluczam, że to już jest bardziej przypadłością samego recenzenta niż pracy.

Wszystkie przedstawione powyżej pytania i uwagi nie mają wpływu na moją jednoznacznie pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej.

Chciałbym również podkreślić, że oprócz wyników zaprezentowanych w niniejszej pracy, Pan Filip Borys jest autorem 13 innych opublikowanych prac naukowych oraz 7 rozdziałów w książkach. Łącznie jego publikacje były cytowane 153 razy w literaturze światowej. Warto również zaznaczyć, że jest Autorem 4 zgłoszeń patentowych.

Podsumowując, zarówno dorobek naukowy, jak i przedstawiona rozprawa doktorska mgr inż. Filipa Borysa zasługują na bardzo wysoką ocenę.

W moim przekonaniu Autor uzyskał wartościowe, stanowiące nowość naukową wyniki, które otwierają szerokie perspektywy badawcze na przyszłość.

Przedłożona praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r., poz. 742 z późn. zm.). Wnoszę zatem o dopuszczenie Pana mgr inż. Filipa Borysa do dalszych etapów przewodu doktorskiego prowadzonego przez Radę Naukową Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej.

(Zbigniew Madeja)

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII UJ