

**Prof. dr hab. Barbara Nawrot**

5 maja 2023 r.

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych  
Polskiej Akademii Nauk  
Dział Chemii Bioorganicznej  
Ul. H. Sienkiewicza 112  
90-363 Łódź  
Tel. +48-604 783945, +48 42 6308 248  
Email: barbara.nawrot@cbmm.lodz.pl  
www.cbmm.lodz.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Drogosz-Stachowicz pt.:**  
**„Badanie właściwości przeciwnowotworowych**  
**i molekularnych mechanizmów działania pochodnych**  
**zawierających szkielet piranonu, chinolinonu**  
**i chinolinodionu”**

Niniejszą recenzję sporządziłam na prośbę Prodziekana ds. Nauki Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Pani prof. dr hab. n. med. Agnieszki Piastowskiej-Ciesielskiej w związku z powołaniem mnie przez Radę Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Drogosz-Stachowicz. Zgodnie z art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w przedstawionej rozprawie doktorskiej oceniłam oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz ogólną teoretyczną wiedzę Doktorantki w dziedzinie Nauk Medycznych, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej pod opieką promotora.

***Ocena formalna***

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. med. Anny Janeckiej w Zakładzie Chemii Biomolekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i jest wynikiem współpracy z prof. dr hab. Tomaszem Janeckim z Instytutu Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej. Prof. Janecki udostępnił 46 związków organicznych zsyntezowanych w Jego zespole, które to związki stanowiły obiekty badań biologicznych przedstawionych w rozprawie, w szczególności do badań właściwości

przeciwnowotworowych oraz do badań molekularnych mechanizmów działania tych związków w modelowych komórkach i w systemie *in vivo*.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska zawiera 141 stron maszynopisu, w tym 58 rysunków (poprawniej byłoby rycin) i 8 tabel. Rozprawa zbudowana jest w sposób klasyczny, charakterystyczny dla rozpraw doktorskich i obejmuje Spis treści, Wykaz stosowanych skrótów, Streszczenie w języku polskim oraz Streszczenie w języku angielskim, Część teoretyczną przedstawiającą aktualny stan wiedzy związanej z tematyką rozprawy (25 stron), opis Założeń i celu pracy, Część doświadczalną (Materiały i metody 11 stron), Wyniki badań własnych (47 stron), Dyskusję otrzymanych wyników (15 stron), oraz Wnioski końcowe. Uzupełnieniem treści rozprawy jest spis dorobku publikacyjnego Doktorantki liczący 14 prac opublikowanych w czasopismach z listy JCR i jednej pracy wysłanej do recenzji, oraz Bibliografia licząca 237 pozycji. Zarówno struktura rozprawy jak i zawartość merytoryczna poszczególnych części są poprawnie opisane, a dobrze przygotowany Spis treści ułatwia lekturę pracy.

### **Ocena merytoryczna**

Część teoretyczna została podzielona na 5 podrozdziałów, w których Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała obecny stan wiedzy na temat częstości występowania w skali globalnej i przyczyn powstawania różnych nowotworów, przy czym te ostatnie podzieliła na czynniki wewnętrzne, zewnętrzne i dziedziczne. Podkreśliła znaczenie czynników wewnętrznych takich jak mutacje genetyczne, zmiany epigenetyczne, zmieniona ekspresja genów, czy rola nowotworowych komórek macierzystych. Do czynników zewnętrznych zaliczyła wirusy, bakterie, zakażenia pasożytnicze, środki chemiczne oraz promieniowanie radioaktywne i elektromagnetyczne. Wśród czynników dziedzicznych najważniejsze to zmutowane geny supresorowe. Ciekawym podrozdziałem z punktu widzenia popularyzatorskiego jest opis historii rozwoju terapii przeciwnowotworowych, w tym odkrycie chemioterapeutycznego działania gazów musztardowych i konsekwencji tego odkrycia w rozwoju takich leków jak cyklofosfamid czy ifosfamid. Nawiasem mówiąc, synteza czystych enancjomerów tych fosforoorganicznych leków została oryginalnie opracowana w zespole Pana profesora Wojciecha Steca, znanego polskiego chemika pracującego w CBMiM PAN w Łodzi i zajmującego się stereochemią organicznych związków fosforu. Doktorantka opisała też szczegółowo odkrycie, mechanizm działania i rozwój leków na bazie antagonistów kwasu foliowego, antymetabolitów, antybiotyków przeciwnowotworowych i związków pochodzenia roślinnego, takich jak taksol, winblastyna czy kamptotecyna, wykazujących silne działanie przeciwnowotworowe i rozwiniętych do obecnie stosowanych chemioterapeutyków. Niemalże znaczenie mają też leki odkryte przypadkowo, takie jak np. cis-platyna czy mitoksantron. **Z całą pewnością ten fragment Części teoretycznej mógłby stanowić, po pewnych poprawkach i uzupełnieniach, tekst artykułu popularno-naukowego, do przygotowania którego zachęcam Doktorantkę.** Ostatni podrozdział tej części został poświęcony omówieniu właściwości biologicznych związków zawierających struktury wiodące występujące w pochodnych będących przedmiotem rozprawy. **Podsumowując, opracowana treść Części teoretycznej recenzowanej rozprawy doktorskiej świadczy o właściwym zaznajomieniu się Doktorantki z uprawianą tematyką i dobrze wprowadza czytelnika w aktualny stan wiedzy dotyczącej leków przeciwnowotworowych.**

**Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę Doktorantki na kilka istotnych błędów merytorycznych i stylistycznych zawartych w tekście. Np. nieprawidłowo użyte sformułowania:**

„dołączenie grupy metylowej w pozycji 5'-cytozyny” a powinno być „podstawienie grupy metylowej w pozycji 5 cytozyny”, i dalej, „cząsteczek metylowych” zamiast „grup metylowych”. Nawiasem mówiąc, w epigenetyce DNA występują też modyfikacje cytozyny w pozycji 5 pierścienia nukleozasady powstałe na skutek utlenienia grupy  $\text{CH}_3$ , a mianowicie 5-hydroksymetylo-cytozyna ( $\text{HO-CH}_2$ -), 5-karbonylo-cytozyna ( $\text{CH(O)-}$ ) i 5-karboksy-cytozyna ( $\text{HOC(O)-}$ ), o których pisząc artykuł przeglądowy można by również wspomnieć. Zamiast używać sformułowania „w okresie czasu” wystarczy użyć „w okresie” lub „w czasie” czy też zamiast „w wypadku” lepiej użyć „w przypadku”. Pragnę też zwrócić uwagę na powszechnie występujący w tekstach naukowych błąd, a mianowicie użycie sformułowania: „hamowanie mRNA”, „hamowanie białka”, „hamowanie enzymu”, które często występuje w tekście tej rozprawy. Poprawnie powinno się używać sformułowania „hamowanie czytania/przepisywania/translacji mRNA”, „hamowanie aktywności enzymu”, itd. I dalej, poprawnie nazwa enzymu brzmi „syntaza tymidylanowa” a nie „synteza” czy „syntetaza tymidylanowa”. Przy okazji pytanie do Doktorantki, czym różnią się od siebie enzymy nazwane jako syntaza i syntetaza. I jeszcze uwaga odnośnie używania symboli związków tymidyny, nukleozydu DNA, który z definicji jest nukleozydem zawierającym resztę 2'-deoksyrybozy. Niepoprawne jest więc używanie skrótów typu dTTP czy dTMP, wystarczy TTP czy TMP. Niezręcznie użyto zwrotu „(nadmiar substratów) przytłacza enzym”, może lepiej byłoby użyć sformułowania „nadmiar substratów wysyca enzym”? Nazwa związku na Rys. 13 jest nieprawidłowa, prawidłowo jest to „tetrahydropiran-4-on”.

Celem ocenianej rozprawy było „zbadanie właściwości przeciwnowotworowych wybranych analogów, a w szczególności poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych”. Cel pracy został podzielony na cztery cele szczegółowe, w tym:

1. Określenie poziomu cytotoksyczności związków w stosunku do linii komórek nowotworowych (zawiesinowych HL-60 oraz adherentnych MCF-7) i w wybranych przypadkach do komórek prawidłowych (HUVEC i MCF-10A).
2. Z każdej z trzech badanych grup pochodnych wyselekcjonowanie związków o największej cytotoksyczności lub selektywności.
3. Zbadanie wpływu wybranych związków na morfologię i proliferację komórek, określenie szlaków apoptotycznych, cykl komórkowy i indukcję uszkodzeń DNA, określenie poziomu reaktywnych form tlenu oraz potencjału błony mitochondrialnej, a także zbadanie aktywacji wybranych ścieżek sygnałowych.
4. Określenie maksymalnej tolerowanej dawki jednego z najbardziej cytotoksycznych lub selektywnych związków oraz jego wpływu na rozwój nowotworu u myszy.

Realizację poszczególnych celów szczegółowych pracy doktorskiej Doktorantka opisała bardzo dokładnie i przejrzyście w rozdziale Wyniki.

W serii I wywodzącej się ze struktury 3-metylidenochinolin-5-onów zbadana 13 związków zawierających zróżnicowany podstawnik R w pozycji 2 pierścienia chinolinonu. Związki te zostały użyte w formie mieszanin racemicznych różniących się konfiguracją absolutną na stereogenicznym atomie węgla C2. Podstawnikami R były grupy alkilowe lub aryłowe. W serii II badaniom poddano 15 pochodnych metylidenotetrahydropiran-4-onów zawierających dwa podstawniki R1 i R2, będące grupami alkilowymi lub aryłowymi. W ostatniej zbadanej serii ewaluowano właściwości 18 regioizomerycznych związków o strukturze *syn*- i *anti*-3-deoksyfosforylofurochinolino-4,9-dionów.

Związki te były analogami uprzednio scharakteryzowanych w zespole prof. Janeckiej pochodnych, w których w szkielet naftofurano-4,9-dionu wprowadzono atom azotu, w nadziei otrzymania związków o wyższym potencjale przeciwnowotworowym. Struktury poszczególnych grup związków przedstawiono odpowiednio w Tabelach 4, 6 i 7. Zgodnie z ogólnie przyjętym schematem postępowania w poszukiwaniu nowych leków przeciwnowotworowych w pierwszym etapie Doktorantka przeprowadziła rutynowe badania cytotoksyczności na dwóch liniach komórek nowotworowych – ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej HL60 i linii hormonozależnego raka piersi MCF-7 oraz, dla porównania, w komórkach prawidłowych HUVEC, tj. ludzkich pierwotnych komórkach śródbłonna żyły pępowinowej (**a nie liniach komórkowych jak to opisano w części Materiały, str. 43 i dalej w tekście**), oraz w linii prawidłowych komórek śródbłonna gruczołu piersiowego MCF-10A. Aktywność mitochondrialna enzymów komórkowych zdolnych do redukcji soli tetrazoliowej do nierozpuszczalnego formazanu została wyznaczona w teście spektrofotometrycznym MTT, po 24- lub 48-godzinnej inkubacji komórek z każdym ze związków. Związkiem referencyjnym była tutaj karboplatyna, znany i stosowany lek cytostatyczny. Doktorantka wyznaczyła wartości  $IC_{50}$  dla większości związków (tj. stężenia związku, przy którym aktywność metaboliczna komórek spada do 50% w stosunku do kontroli, tj. komórek nietraktowanych związkami). Ponadto dla związków serii I i III obliczyła także wartość parametru selektywności tj. stosunku  $IC_{50}$  komórek prawidłowych do  $IC_{50}$  komórek rakowych. W ten sposób z każdej serii związków wyselekcjonowała kandydatów do dalszych, bardziej zaawansowanych badań komórkowych.

Związki z serii I okazały się znacznie bardziej cytotoksyczne w stosunku do komórek białaczkowych HL-60 niż komórek MCF-7 wyprowadzonych z raka sutka. Wykorzystując tutaj metodykę endogennej syntezy DNA w obecności analogu tymidyny, jakim jest 5-bromo-2'-deoksyurydyna, oraz analizy cyklu komórkowego fluorescencyjnie wyznakowanych komórek, wykazała, że **związek nr. 2 z serii chinolinonów**, zawierający na stereogenicznym atomie węgla podstawnik etylowy, silnie i w sposób stężeniowo-zależny wpływał na obniżenie proliferacji komórek HL-60, powodując indukcję fragmentacji DNA i zatrzymanie komórek w fazie sub-G0/G1 cyklu komórkowego. Śmierć komórek następowała na drodze apoptozy, **co jest korzystne dla potencjalnego leku, a co zostało ewidentnie wykazane** w kilku testach komórkowych takich jak zmiana cech morfologicznych, translokacja fosfatydyloseryny i zmiana populacji komórek we wczesnej (zmniejszanie) i późnej fazie apoptozy (wzrost), oraz testy potwierdzające fragmentację DNA. Okazało się, że **związek 2** wywołuje śmierć komórki na szlaku receptorowym w niższym stężeniu (0,5  $\mu$ M), a przy wyższym stężeniu (1,0  $\mu$ M) aktywowany jest również szlak mitochondrialny. W badaniach tych Doktorantka wykazała się umiejętnością oznaczenia poziomu ekspresji genów badanych kaspaz 3, 8 i 9, za pomocą odwrotnej transkrypcji badanego mRNA i reakcji łańcuchowej polimerazy cDNA w czasie rzeczywistym (RT-qPCR) oraz analizy indukcji wczesnej apoptozy w komórkach traktowanych związkiem **2** i inhibitorami poszczególnych kaspaz. Doktorantka odkryła także, że **związek 2** prowadzi do depolaryzacji zewnętrznej błony komórkowej mitochondrium, ale obserwowane zmiany nie były spowodowane podwyższonym poziomem reaktywnych form tlenu, a raczej wynikały ze wzrostu stężenia receptora błonowego Fas, odpowiedzialnego za indukcję kaskady kaspaz wprowadzających komórkę na szlak apoptozy. Finalnie, wykorzystując metodę qPCR i immunoblot przeznaczony do profilowania ekspresji kluczowych białek w kaskadach sygnałowych kinaz MAP, porównujący poziom białek ufosforylowanych w lizacie komórek nietraktowanych i badanych, wykazała obniżenie poziomu fosforylacji właściwie większości reprezentatywnych kinaz aktywowanych mitogenami. Wynik ten, w interpretacji Doktorantki sugeruje, iż zahamowanie szlaku MAPK może być jedną z przyczyn

cytotoksyczności **związku 2**. Na stronie 109 w rozdziale Dyskusja Doktorantka trafnie zobrazowała możliwe ścieżki śmierci komórek HL-60 indukowane za pomocą pochodnej 2.

W kolejnym etapie badań stwierdzono, że większość związków z grupy *trans*-2,6-dipodstawionych metylidenotetrahydropiran-4-onów (seria II) nie wykazuje korzystnej selektywności w stosunku do komórek nowotworowych w porównaniu do komórek prawidłowych. Tym niemniej, do dalszych pogłębionych badań w kierunku potencjalnych leków przeciwnowotworowych Doktorantka wyselekcjonowała **pochodną 20** z podstawnikami R1 i R1 będącymi grupami fenylową i izopropylową, która okazała się najbardziej cytotoksyczna dla komórek HeLa i MCF-7 oraz **pochodną 17**, z podstawnikami izopropylowymi, która w tym systemie była najbardziej selektywna. Ciekawi mnie, dlaczego pominięte zostały np. związki nr. **23** i **26** o identycznym IC<sub>50</sub> dla komórek HL-60 (obserwowane różnice w IC<sub>50</sub> mieściły się w granicach błędu). Dla pochodnych **17** i **20** Doktorantka przeprowadziła analogiczny do poprzedniego cykl badań na komórkach HL-60. Stwierdziła, że obydwie związki znacząco hamowały proliferację komórek, indukowały apoptotyczną śmierć komórki, ale dopiero w dwukrotnie wyższym stężeniu niż IC<sub>50</sub> (2xIC<sub>50</sub>). Ciekawe, że w tak wysokim stężeniu związek **20** był znacznie mniej genotoksyczny niż związek **17**. Co więcej, aktywność inhibitorowa tych dwóch związków była wysoka w stosunku do topoizomerazy II $\alpha$ , odpowiedzialnej za zdolność do relaksacji dwuniciowego DNA. Ponieważ w komórkach nowotworowych obserwowana jest nadekspresja tego enzymu, topoizomeraza II $\alpha$  uważana jest za uznany cel terapeutyczny. W Dyskusji przedstawiono proponowany schemat cytotoksycznego mechanizmu działania badanych tetrahydropiranonów (Rysunek 56), przebiegający poprzez zahamowanie aktywności enzymu Top2 $\alpha$ , indukcję dwuniciowych pęknięć DNA, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, prowadzące do apoptozy komórki nowotworowej, co wydaje się racjonalnym i możliwym przebiegiem tego procesu. **Podsumowując, ważnym odkryciem w tej części badań było zidentyfikowanie związków, które mogą być dalej optymalizowane w kierunku inhibitorów aktywności topoizomerazy II $\alpha$ .**

Ostatnia zbadana grupa 18 regioizomerycznych związków o strukturze *N,O-syn*- i *N,O-anti*-3-deoksyfosforylofurochinolino-4,9-dionów (seria III) wykazała zdecydowanie wysoką aktywność cytotoksyczną zarówno w komórkach białaczkowych jak i raka piersi, wywoływaną zwłaszcza przez regioizomery *N,O-syn*-. Związki te okazały się być 15-30-krotnie bardziej aktywne w komórkach HL-60 i 2-5-krotnie bardziej aktywne w komórkach MCF-7 niż związki wiodące, naftofuranony, nie zawierające atomu azotu (dane opublikowane wcześniej przez Zespół prof. Janeckiej), **co potwierdziło założoną tutaj hipotezę badawczą**. Szczegółowa analiza właściwości dwóch wysoce selektywnych pochodnych **29c** (*N,O*-regioizomer *syn* z resztą *p*-metoksyfenylową) i **29i** (z resztą *o*-chlorofenylną) wykazała ich antyproliferacyjny wpływ na komórki HL-60, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S i stężeniowo-zależne pro-apoptotyczne właściwości indukowane poprzez mechanizm aktywacji kaspaz 7 i 3 oraz dwuniciowe pęknięcia DNA. W tym projekcie Doktorantka zainteresowała się również wpływem badanych związków na aktywność enzymów antyoksydacyjnych, w tym ulegającym nadekspresji w komórkach rakowych enzymem NQO1 tj. oksydoreduktazą NAD(P)H:chinonu 1. W oparciu o doniesienia literaturowe mówiące o korzystnym wpływie inhibitorów tego enzymu na indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych Doktorantka wykazała, że wyselekcjonowane przez nią związki wpływają hamująco na aktywność oksydoreduktazy uwrażliwiając komórki nowotworowe na stres oksydacyjny, co w konsekwencji prowadziło do zmniejszenia proliferacji i do apoptozy komórek. Zaproponowała oryginalny mechanizm działania związków **29c** i **29i** (schemat 57) prowadzący do śmierci komórek HL-60.

Jako, że związek **29i** wykazywał silniejsze właściwości inhibitorowe w stosunku do oksydoreduktazy NQO1 niż związek **29c**, Doktorantka poszerzyła zakres badań nad wpływem **29i** na dwa rodzaje komórek raka piersi, a mianowicie komórki MCF-7 i komórki potrójnie ujemnego raka piersi MDA-MB-231 oraz, kontrolnie, komórki nabłonka gruczołu piersiowego MCF-10A. W analogicznej do poprzedniej serii badań **odkryła interesującą zależność** pokazującą, że komórki bardziej agresywnego raka piersi w mniejszym stopniu reagują na stosowaną terapię, tzn. ich proliferacja nie zostaje zmniejszona tak jak proliferacja komórek MCF-7, nie wykazują zmian cyklu komórkowego, znacznie później uruchamiany był proces apoptozy i w tym procesie nie miały znaczenia dwuniciowe uszkodzenia DNA, które prawdopodobnie ulegały naprawie zanim zdążyły zaindukować śmierć komórki. **Bardzo trafnie skonkludowała**, że wykazane tutaj różnice mogą tłumaczyć obserwowaną oporność komórek potrójnie ujemnego raka piersi MDA-MB-231 na stosowane terapie przeciwnowotworowe.

Finalnie, aktywność związku **29i** była także zbadana w warunkach *in vivo*, co nieczęsto się zdarza podczas realizacji prac doktorskich. Doktorantka określiła wpływ **29i** na wielkość guza w modelu mysim C3H z wszczepionym mysim nowotworem sutka. Badania te, początkowo mające na celu oznaczenie toksyczności związku, były wykonane na łącznie 15 myszach z dawką eskalującą dla kolejnych 3 myszy od 20mg/kg m.c. wzwyż (2x zwiększanie kolejnej dawki). Obserwacje prowadzono po 48 godz. od podania związku. Zwierzęta nie wykazały objawów toksyczności związku, w tym utraty masy ciała, zmian w wyglądzie, postawie ciała, ruchliwości czy zmian w miejscu podania związku do dawki 160 mg/kg m.c., którą to dawkę przyjęto jako dawkę maksymalną. W drugiej fazie badania przeprowadzono na 18 myszach, z czego połowa myszy otrzymała placebo, a druga połowa codziennie była traktowana ¼ dawki maksymalnej. Szczegółowe pomiary masy ciała i wielkości guza przez okres obserwacji (30 dni), a następnie analiza guzów po uśmierceniu sugerowały, że u myszy traktowanych lekiem nastąpiło znaczne zmniejszenie średniej masy guza w porównaniu z myszami kontrolnymi, ale wynik nie był statystycznie istotny ( $P > 0.27$ ). Podsumowując ten ostatni fragment badań związków z serii chinolinodionów Doktorantka zaproponowała schemat działania związku **29i** w komórkach raka piersi MCF-27 i MBA-MB-231 oraz *in vivo* na transgenicznej myszy C3H z przeszczepionym mysim guzem piersi (Rysunek 58).

Dyskusja wyników, pokazująca molekularne mechanizmy wszystkich trzech serii badanych związków została przeprowadzona rzetelnie i w oparciu o najnowsze doniesienia literaturowe.

Ciekawa jestem czy Doktorantka sama wykonywała doświadczenia *in vivo*, w tym np. czy przygotowywała myszy transgeniczne, czy analizowała materiał po resekcji? Podjęcie takich badań i osobiste ich wykonanie z pewnością było wielkim wyzwaniem i pokazało determinację Doktorantki w uzyskaniu końcowych wyników.

**Do tej części rozprawy mam też kilka uwag krytycznych:**

**1. Doktorantka powszechnie błędnie stosowała określenie „analog” dla kolejnych pochodnych związków wiodących. Przypomnę więc, że „analog” to związek chemiczny, w którym co najmniej jeden atom jest zastąpiony innym w stosunku do związku wyjściowego, natomiast ogólna budowa pozostaje niezmienną. Analogiem ditlenku węgla CO<sub>2</sub> jest disiarczek węgla CS<sub>2</sub>. Prawdłowo, serie związków wywodzących się ze związku wiodącego powinny być nazywane „pochodnymi”. Oznacza to, że jest to związek chemiczny powstały przez zastąpienie jednego lub kilku atomów cząsteczki (najczęściej atomu/atomów wodoru) grupą funkcyjną lub grupą innych atomów. Np. metanol CH<sub>3</sub>OH jest pochodną metanu (CH<sub>4</sub>).**

2. W rozprawie zastosowano określenie „Rysunek” zarówno do przedstawienia schematów, wzorów chemicznych, jak i wszelkiego rodzaju wykresów z programu Excel, a także zdjęć immunoblotów, obrazów z cytometru przepływowego czy fotografii guzów. Moim zdaniem bardziej stosowne byłoby tutaj zastosowanie określenia „Rycina” co jest pojęciem szerszym i nie kłóci się z ilustracjami innymi niż wykresy.

3. Co Doktorantka miała na myśli stwierdzając, że „Mitochondrialny szlak apoptozy jest jedną z najczęściej rozregulowanych form śmierci komórek nowotworowych.” Czy rozregulowany jest mitochondrialny szlak indukcji apoptozy, czy być może komórki poddane działaniu cytotoksycznego związku?

4. Podaję też kilka przykładów niepoprawnie użytych sformułowań, np. „wzrost RTF” (str. 114), „regulacja białek związanych z apoptozą” czy „redukcja dwóch elektronów” (str. 115).

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy, a są jedynie uwagami mającymi zwrócić uwagę Doktorantki na poprawność stosowania nazw i wyrażeń w tekstach naukowych.

### *Podsumowanie*

Podsumowując stwierdzam, że Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą w tematyce rozprawy doktorskiej i zrealizowała założone cele badawcze uzyskując oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Praca jest eksperymentalnie bardzo obszerna, przeprowadzona wnikliwie i zgodnie z wysokimi standardami naukowymi. Opisuje pogłębione badania mające na celu scharakteryzowanie właściwości przeciwnowotworowych trzech serii badanych związków, pozyskanych w bardzo udanej współpracy z zespołem prof. Tomasza Janeckiego z IChO PŁ. Wachlarz zdobytej wiedzy i umiejętności praktycznych spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Doktorantka wykazała się samodzielną pracą naukową, dokonała szeregu istotnych odkryć i zidentyfikowała związki i mechanizmy ich cytotoksycznego działania w komórkach rakowych, które mogą być dalej rozwijane w kierunku nowych leków przeciwnowotworowych. Zakres stosowanych metod jest szeroki, od badań *in vitro* prowadzonych na ludzkich komórkach zawieszinowych i adherentnych, zarówno prawidłowych jak i rakowych, po badania *in vivo*, na mysim modelu raka piersi. Należy tutaj podkreślić, że poszczególne doświadczenia wykonano w wymaganej ilości powtórzeń, a uzyskane wyniki były starannie zanalizowane pod względem istotności statystycznej i zilustrowane na odpowiednich wykresach, fotografiach i schematach. Doktorantka świetnie dała sobie radę z interpretacją otrzymanych wyników, co wynikało nie tylko z dobrej jakości zamieszczonych w rozprawie ilustracji, ale także z wiedzy teoretycznej i praktycznej zdobytej w trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej. Opisane przez Doktorantkę badania dotyczące ciekawych i aktualnych zagadnień naukowych, zostały wykonane z wykorzystaniem nowoczesnych i dobrze dobranych metod, które pozwoliły na uzyskanie wartościowych i ważnych poznawczo wyników. Uważam, że Pani Joanna Drogosz-Stachowicz zrealizowała założone cele badawcze i stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Dorobek publikacyjny Doktorantki jest godny pochwały, ponieważ jest ona współautorką aż 14 publikacji z listy JCR, z tego w dwóch pracach jako pierwsza i pięciu jako druga autorka, co świadczy o umiejętności profesjonalnego prowadzenia badań naukowych i potwierdza jej osobiste zaangażowanie w te badania.

### ***Wniosek końcowy***

Na podstawie wyżej omówionych osiągnięć stwierdzam, że przedstawiony do oceny materiał spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wniosuję do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr Joanny Drogosz-Stachowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę szeroki zakres przeprowadzonych badań jak i wartość merytoryczną uzyskanych wyników, w tym zidentyfikowanie kilku związków odpowiednich do dalszych badań w kierunku rozwijania nowych leków przeciwnowotworowych, a także znakomity dorobek publikacyjny wniosuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.