Prof. dr hab. Monika Wujec
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin, 27.07.2026

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Rostyslava Dudchaka pt.: „ Synteza i właściwości przeciwnowotworowe nowych pochodnych 4-tiazolidynonu” wykonanej w Katedrze Syntezy i Technologii Leków Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem dwóch promotorów:

prof. dr hab. Krzysztofa Bielawskiego oraz prof. dr hab. Romana Lesyka

Choroby nowotworowe stanowią obecnie jedno z najpoważniejszych wyzwań zdrowia publicznego na świecie i pozostają jedną z głównych przyczyn przedwczesnej śmiertelności. Pomimo znaczącego postępu w zakresie diagnostyki, profilaktyki oraz terapii przeciwnowotworowej, globalne obciążenie chorobami nowotworowymi systematycznie wzrasta. Według danych International Agency for Research on Cancer (IARC), w 2022 roku na świecie odnotowano około 20 mln nowych przypadków nowotworów oraz 9,7 mln zgonów z ich powodu. Oznacza to, że w ciągu życia choroba nowotworowa rozwinie się u około jednej na pięć osób, natomiast ryzyko zgonu z jej powodu dotyczy około jednego na dziewięciu mężczyzn i jednej na dwanaście kobiet. Najnowsze dane World Health Organization (WHO) wskazują, że nowotwory odpowiadają za niemal 10 mln zgonów rocznie i pozostają jedną z głównych przyczyn śmierci na świecie.

Najczęściej diagnozowanymi nowotworami są obecnie rak płuca, rak piersi, rak jelita grubego i odbytnicy oraz rak gruczołu krokowego. Szczególnie istotnym problemem pozostaje rak płuca, który nie tylko należy do najczęściej rozpoznawanych chorób nowotworowych, ale jest również główną przyczyną zgonów onkologicznych na świecie. Wysoką śmiertelnością charakteryzują się także nowotwory jelita grubego, wątroby, żołądka oraz piersi. Istotnym czynnikiem determinującym rokowanie pozostaje stadium zaawansowania choroby w momencie rozpoznania.

Prognozy epidemiologiczne wskazują, że znaczenie nowotworów jako globalnego problemu zdrowotnego będzie w kolejnych dekadach nadal wzrastać. Szacuje się, że do 2050 roku liczba nowych przypadków może osiągnąć około 35 mln rocznie, co oznacza wzrost o około 77% w porównaniu z 2022 rokiem. Tendencja ta związana jest przede wszystkim ze wzrostem i starzeniem się światowej populacji, ale także ze zwiększoną ekspozycją na czynniki ryzyka związane ze stylem życia i środowiskiem.

Rosnąca zapadalność i wysoka śmiertelność powodują, że choroby nowotworowe stanowią nie tylko problem medyczny, lecz również istotne obciążenie społeczne i ekonomiczne. Długotrwałe leczenie, nawroty choroby, rozwój oporności na stosowane terapie oraz działania niepożądane leczenia wpływają na jakość życia pacjentów, jednocześnie generując coraz większe koszty dla systemów ochrony zdrowia. Szczególnym wyzwaniem pozostają znaczne nierówności w dostępie do profilaktyki, wczesnej diagnostyki i nowoczesnego leczenia pomiędzy poszczególnymi regionami świata. W konsekwencji dalszy rozwój skuteczniejszych i bardziej selektywnych metod terapii, identyfikacja nowych celów molekularnych oraz poszukiwanie nowych związków o aktywności przeciwnowotworowej pozostają jednym z priorytetowych kierunków współczesnych badań biomedycznych i farmaceutycznych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wpisuje się w wieloletni nurt badań prowadzonych przez znakomitego naukowca prof. Krzysztofa Bielawskiego, ukierunkowanych na projektowanie, syntezę i ocenę aktywności biologicznej nowych związków o potencjalnym zastosowaniu w terapii przeciwnowotworowej. Poszukiwanie nowych substancji wykazujących wysoką aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych, a jednocześnie odpowiednią selektywność względem komórek prawidłowych, pozostaje jednym z istotnych kierunków współczesnej chemii medycznej. Szczególne znaczenie ma identyfikacja struktur wiodących, które po dalszej optymalizacji właściwości farmakodynamicznych i farmakokinetycznych mogłyby stanowić punkt wyjścia do opracowania nowych kandydatów na leki przeciwnowotworowe.

Drugi promotor, prof. Roman Lesyk, posiada bogate doświadczenie w zakresie syntezy substancji biologicznie aktywnych, w szczególności pochodnych tiazolidynonu. Pochodne tiazolidynonu są opisywane w literaturze jako struktury wykazujące m.in. aktywność przeciwnowotworową, przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą i przeciwzapalną. Z punktu widzenia niniejszej rozprawy szczególnie istotny jest ich potencjał przeciwnowotworowy oraz

możliwość modyfikowania podstawowego układu heterocyklicznego w celu uzyskania związków o korzystniejszym profilu aktywności i selektywności.

Połączenie doświadczenia obu naukowców stworzyło zatem racjonalne podstawy do zaprojektowania przedstawionych w rozprawie badań. Takie podejście pozwoliło nie tylko na otrzymanie nowych związków, ale przede wszystkim na ich ocenę jako potencjalnych struktur wiodących oraz próbę określenia zależności struktura–aktywność. W mojej ocenie stanowi to logiczną i wartościową kontynuację dotychczasowych badań prowadzonych w Jednostce, a jednocześnie pokazuje, w jaki sposób komplementarne kierunki badawcze mogą zostać wykorzystane do realizacji wspólnego celu, jakim jest poszukiwanie nowych kandydatów na leki przeciwnowotworowe.

Praca doktorska Pana Rostyslava Dudchaka została przedstawiona do recenzji w formie cyklu dwóch publikacji opublikowanych w latach 2025-2026, w czasopismach o łącznym współczynniku oddziaływania IF = 9,8, opatrzonych 36-stronicowym komentarzem w języku angielskim. Prace mają charakter opracowań wieloautorskich. Dołączone do komentarza oświadczenia współautorów wskazują na dominujący udział Doktoranta w realizacji badań oraz przygotowaniu manuskryptów (70-80%). Komentarz zawiera *Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej*, *Wykaz stosowanych skrótów*, *Wstęp*, *Cel pracy*, opis badań (*Materiały i metody*, *Synteza nowych związków, Badania aktywności przeciwnowotworowej*, *Dyskusja i Podsumowanie*), *Literatur*ę, *Streszczenie* w języku polskim i angielskim. Do komentarza dołączone są kopie publikacji. Na końcu Doktorant umieścił ankietę dorobku naukowego. Komentarz jest napisany poprawnym językiem. Oparty jest na 43 właściwie dobranych i cytowanych pozycjach literaturowych.

We wstępie Doktorant podaje dane statystyczne na temat zachorowalności na choroby nowotworowe, a także podstawowe informacje na temat leków zatwierdzonych w ostatnich latach przez FDA do stosowania w terapii nowotworów. W dalszej części wprowadzenia Doktorant przedstawia znaczenie związków heterocyklicznych we współczesnej chemii medycznej, koncentrując uwagę na pochodnych 4-tiazolidynonu jako strukturach o szerokim spektrum aktywności biologicznej i istotnym potencjale przeciwnowotworowym. Omawia możliwości modyfikacji tego układu, ze szczególnym uwzględnieniem pochodnych 5-enowych, a także przedstawia najważniejsze cele molekularne i mechanizmy odpowiedzialne za ich działanie przeciwnowotworowe, w tym indukcję apoptozy oraz generowanie reaktywnych

form tlenu. Fragment ten uzupełnia charakterystyka najważniejszych metod syntezy pochodnych 5-eno-4-tiazolidynonu. Całość stanowi logiczne uzasadnienie wyboru tej grupy związków jako przedmiotu badań podjętych w rozprawie.

Celem pracy było zaprojektowanie, synteza oraz ocena potencjału przeciwnowotworowego związków zawierających 4-tiazolidynon jako podstawowy element strukturalny, ze szczególnym uwzględnieniem jego 5-enowych pochodnych.

Pierwszym etapem pracy była synteza pięciu nowych pochodnych 5-eno-4-tiazolidynonu. Syntezę prowadzono z wykorzystaniem znanej reakcji dwuetapowej, obejmującej cyklizację 2-chloro-N-(3,4,5-trimetoksyfenylo)acetamidu pod wpływem nadmiaru tiocyjanianu amonu w środowisku acetonu. Powstały 2-((3,4,5-trimetoksyfenylo)amino)tiazolo-4(5H)-on, bez dodatkowego oczyszczania, wykorzystano w kolejnym etapie w reakcji kondensacji Knoevenagla z aldehydem 4-metoksybenzoesowym, indolo-6-karboaldehydem, indolo-3-karboaldehydem, tiofeno-2-karboaldehydem oraz furano-2-karboaldehydem. W wyniku tych reakcji otrzymano odpowiednie pochodne 5-aryl(hetaryl)idenowe z wydajnościami w zakresie 58–67%.

W celu optymalizacji procesu syntezy 5-eno-2-((3,4,5-trimetoksyfenylo)amino)tiazolo-4(5H)-onów opracowano i zaproponowano protokół reakcji trójskładnikowej. Nowatorski i oryginalny charakter opisanej procedury polega na jednoetapowej reakcji typu *one-pot* 2-chloro-*N*-(3,4,5-trometoksyfenylo)acetamidu, tiocyjanianu amonu oraz aldehydów, prowadzonej w środowisku propan-2-olu w obecności dioctanu etylenodiaminy jako katalizatora.

Struktury otrzymanych pochodnych potwierdzono metodami: ^{1}H NMR, ^{13}C NMR oraz LC–MS.

Następnym etapem pracy badawczej była ocena aktywności cytotoksycznej otrzymanych związków wobec komórek różnych linii nowotworowych: raka piersi (MCF-7, MDA-MB-231), raka żołądka (AGS), raka jelita grubego (HT29, DLD-1), glejaka wielopostaciowego (T98G, A172) oraz komórek prawidłowych: astrocytów wyizolowanych z móżdżku myszy (C8-D1A), prawidłowych komórek nabłonkowych piersi (MCF-10A) i fibroblastów (HDFa).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że syntezowane związki wykazywały znaczącą aktywność wobec szeregu linii komórkowych, takich jak MCF-7, DLD-1, HT-29, AGS, A172 i T98G. Najbardziej obiecujące wyniki uzyskano wobec komórek hormozależnego raka piersi MCF-7, szczególnie w przypadku związków Les-6416, Les-6418 oraz Les-6381. Pochodne z pięcioczłonowym układem heteroaromatycznym nie wykazały aktywności cytotoksycznej w stosunku do badanych komórek.

Związek z podstawnikiem 4-metoksyfenylowym wykazywał szersze spektrum aktywności wobec większości badanych linii komórkowych, charakteryzował się jednak większą toksycznością wobec komórek prawidłowych. Dwa pozostałe związki aktywne, Les-6416 i Les-6418, wykazywały większą selektywność działania, przede wszystkim wobec komórek linii MCF-7. Komórki tej linii nowotworowej wybrano do dalszych badań.

Następnie oceniono proapoptotyczne działanie nowych związków, wykorzystując podwójne barwienie aneksyną V-FITC i jodkiem propidyny oraz analizę metodą cytometrii przepływowej. Pozwoliło to na rozróżnienie komórek żywych, nekrotycznych oraz znajdujących się w różnych stadiach apoptozy. Trzy nowe pochodne 5-eno-4-tiazolidynonu – Les-6381, Les-6416 i Les-6418 – wykazały wyraźną zdolność do indukcji apoptozy, prowadząc do śmierci apoptotycznej około 50% badanych komórek. Efekt ten był znacznie silniejszy niż w przypadku zastosowanej jako lek referencyjny doksorubicyny (DOX), dla której odsetek komórek apoptotycznych wynosił około 13%. Jednocześnie DOX powodowała istotny wzrost udziału komórek ulegających martwicy, do 27,23 ± 3,76%, podczas gdy dla nowo zsyntetyzowanych pochodnych odsetek komórek nekrotycznych nie przekraczał 1%. Wyniki te wskazują, że badane pochodne indukowały śmierć komórkową przede wszystkim na drodze apoptozy, przy jednocześnie niewielkim udziale niespecyficznej śmierci nekrotycznej.

W celu oceny zdolności badanych związków do oddziaływania na wewnętrzny lub zewnętrzny szlak apoptozy określono ich wpływ na aktywację poszczególnych kaspaz w komórkach linii MCF-7 po 24 godzinach inkubacji, wykorzystując cytometrię przepływową.

Stwierdzono, że spośród nowych związków Les-6416 charakteryzował się najsilniejszym działaniem we wszystkich przeprowadzonych testach. W celu dokładniejszego określenia wpływu nowych pochodnych na apoptozę i zaangażowane w nią szlaki przeanalizowano ich wpływ na poziom wybranych białek związanych z apoptozą (Bax, cytochromu c i p53), wykorzystując cytometrię przepływową oraz test ELISA. Uzyskane wyniki wskazują, że jedynie Les-6416 powodował statystycznie istotny wzrost poziomu wszystkich trzech badanych białek, podczas gdy w przypadku Les-6418 taki efekt obserwowano wyłącznie dla Bax. Oceniono również wpływ związków Les-6381, Les-6418 i Les-6416 na potencjał błony mitochondrialnej. Wszystkie trzy pochodne powodowały jego obniżenie w ponad 22% populacji komórek, przy czym najsilniejszy efekt obserwowano dla Les-6416 – zmniejszenie potencjału błony mitochondrialnej stwierdzono w 33,80 ± 0,85% komórek. Wyniki te, w połączeniu z

obserwowaną aktywacją kaspazy 9, wskazują na udział mitochondrialnego (wewnętrznego) szlaku apoptozy w mechanizmie działania badanych związków.

Wcześniej opisane pochodne 5-eno-4-tiazolidynonu wykazywały zdolność generowania ROS, dlatego postanowiono przetestować najbardziej obiecujący związek – Les-6416 - pod kątem jego zdolności do zwiększania reaktywnych form tlenu w komórkach MCF-7. Uzyskane wyniki wykazały około dwukrotny wzrost generacji ROS dla Les-6416 po 1 godzinie ekspozycji i około trzykrotny wzrost po 3 godzinach w stężeniu 5 µM.

Kolejno badano wpływ na migrację i tworzenie kolonii MCF-7 po 24 godzinach ekspozycji na Les-6416 i Les-6418. Uzyskane wyniki wskazują, że oba związki znacząco hamowały tworzenie kolonii komórek MCF-7 oraz ich migrację, czego przejawem był istotnie mniejszy odsetek zamknięcia szczeliny w porównaniu z kontrolą.

Ostatni etap badań dotyczył określenia właściwości ADMET za pomocą oprogramowania ADMETLab 3.0. Nowosyntezowane pochodne nie naruszały reguł dla cząsteczek o właściwościach lekopodobnych, w tym Lipińskiego, Pfizera i Złotego Trójkąta. Analiza *in silico* wskazała również na korzystniejszy przewidywany profil biodostępności związku Les-6416 w porównaniu z Les-6418, co Autor interpretuje jako jedną z potencjalnych przyczyn jego silniejszego działania.

Reasumując, cel pracy został w pełni zrealizowany. Zastosowana metodologia badań nie budzi zastrzeżeń, a dobór metod badawczych był właściwy i pozwolił na uzyskanie wiarygodnych wyników oraz realizację założonych celów. Przeprowadzone badania zostały logicznie zaplanowane i obejmowały zarówno otrzymanie oraz charakterystykę nowych pochodnych 4-tiazolidynonu, jak i szeroką ocenę ich aktywności biologicznej. Na szczególne podkreślenie zasługuje kompleksowa charakterystyka aktywności przeciwnowotworowej najbardziej obiecujących związków, obejmująca nie tylko ocenę ich cytotoksyczności i selektywności, ale również próbę wyjaśnienia mechanizmu indukowanej śmierci komórkowej.

Uzyskane wyniki pozwoliły na wytypowanie związku Les-6416 jako najbardziej obiecującej struktury wiodącej oraz wskazanie kierunków dalszych badań nad tą grupą pochodnych.

Chciałabym, aby Doktorant w trakcie obrony ustosunkował się do następujących kwestii:

1. Les-6416 powodował wzrost poziomu ROS już po 1–3 godzinach ekspozycji, natomiast ocenę apoptozy przeprowadzano po 24 godzinach. Czy na podstawie tej zależności czasowej można uznać generowanie ROS za przyczynę indukcji apoptozy? Jak można byłoby eksperymentalnie zweryfikować taką zależność?

2. Les-6416 wykazywał silniejsze działanie niż Les-6418. Autorzy wskazują, że jedną z przyczyn może być korzystniejszy przewidywany profil ADMET i większa biodostępność. Czy przewidywana biodostępność może wyjaśniać różnice aktywności obserwowane w badaniach in vitro na hodowlach komórkowych?
3. Pochodne zawierające pięcioczłonowe układy heteroaromatyczne nie wykazywały aktywności cytotoksycznej, podczas gdy pochodne Les-6416, Les-6418 i Les-6381 były aktywne. Czy na podstawie uzyskanych wyników można sformułować zależności struktura–aktywność, a jeśli tak, które elementy strukturalne uważa Pan za kluczowe dla aktywności przeciwnowotworowej

Podsumowując, uważam, że rozprawa mgr Rostyslava Dudchaka stanowi przykład dobrze zaplanowanej i właściwie zrealizowanej pracy badawczej. Doktorant wykazał się wiedzą teoretyczną niezbędną do prowadzenia badań naukowych, umiejętnością właściwej interpretacji uzyskanych wyników oraz wyciągania adekwatnych wniosków z przeprowadzonych eksperymentów.

Na uwagę zasługuje dorobek publikacyjny Doktoranta. Oprócz dwóch publikacji stanowiących cykl, Doktorant jest współautorem jeszcze czterech wysokopunktowych publikacji w prestiżowych czasopismach o łącznym współczynniku oddziaływania IF=19,8. Ponadto brał czynny udział w konferencjach naukowych, zarówno w Polsce (4), jak i za granicą (3). W trakcie kształcenia w Szkole Doktorskiej odbył pięć staży, cztery w Katedrze Chemii Organicznej UJ CM w Krakowie oraz jeden w Instytucie Gustave Roussy w Paryżu.

Na podstawie przedstawionej rozprawy oraz całokształtu zaprezentowanych osiągnięć stwierdzam, że praca mgr Rostyslava Dudchaka spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r., poz. 1571). W związku z tym wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o nadanie mgr. Rostyslavowi Dudchakowi stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę szeroki zakres przeprowadzonych badań, ich interdyscyplinarny charakter oraz kompleksowe podejście obejmujące zarówno syntezę nowych pochodnych, jak i pogłębioną ocenę ich aktywności biologicznej oraz mechanizmu działania, uważam rozprawę za zasługującą na szczególne uznanie. Na wysoką ocenę zasługuje również dorobek publikacyjny Doktoranta, potwierdzający jego aktywność naukową i

zaangażowanie w prowadzenie badań. Uwzględniając powyższe osiągnięcia, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Rostyslava Dudchaka.