



Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Eweliny Siwiak-Niedbalskiej pt. „Ocena mechanizmów cytotoksycznego współdziałania inhibitorów glikolizy oraz inhibitorów deacetylaz histonów (HDAC) w modelu in vitro glejaka wielopostaciowego”, zrealizowanej w Samodzielnej Pracowni Genetyki i Biologii Molekularnej, Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie, pod kierunkiem dr hab. n. med. inż. Beaty Pająk

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska liczy 150 stron i ma typowy układ prac na stopień naukowy doktora. Można wyodrębnić w niej następujące rozdziały: wstęp (26 stron), który jest poprzedzony spisem treści, wykazem stosowanych skrótów oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim, następnie cel pracy (1 strona), materiały i metody (18 stron), wyniki (38 stron), dyskusja (15 stron), wnioski (1 strona), piśmiennictwo (30 stron) oraz wykazy rycin i tabel (5 stron).

We **Wstępie** starannie przedstawiono zagadnienia związane z glejakami, uwzględniając ich klasyfikację, etiologię, diagnostykę oraz obecne formy terapii, co bardzo dobrze naświetliło problem, będący przedmiotem przeprowadzonych badań. Na kolejnych stronach skupiono się na mechanizmach metabolicznych i epigenetycznych, które próbuje się wykorzystać do rozwoju nowych strategii przeciwnowotworowych. Bardzo szczegółowo opisano proces glikolizy, co jest uzasadnione, gdyż jest on charakterystyczny dla nowotworów i stanowi atrakcyjny cel terapeutyczny. Na przykładzie 2-deoksy-glukozy (2-DG) i jej pochodnych, jako czynników hamujących glikolizę i powiązane ścieżki metaboliczne, zaprezentowano wpływ tych związków na procesy komórkowe, których zaburzenie prowadzi do ograniczenia wzrostu i śmierci komórek nowotworowych. W kontekście mechanizmów epigenetycznych przedstawiono deacetylazy histonów i ich inhibitory, mające już zastosowanie w badaniach klinicznych w onkologii. Tak zarysowany wstęp bardzo przystępnie naświetlił tematykę pracy, umożliwiając pełne zrozumienie oraz docenienie użyteczności przeprowadzonych badań.

Cel pracy jest klarownie sformułowany i opiera się na czterech zadaniach badawczych. Głównym celem badań Doktorantki była analiza skojarzonego działania inhibitorów glikolizy i deacetylaz histonów wobec linii komórkowych glejaka wielopostaciowego. Zadania obejmowały: (1) ocenę aktywności cytotoksycznej inhibitorów glikolizy (2-DG i WP1122) i deacetylaz histonów (maślan sodu/NaBt i soli sodowej kwasu walproinowego/NaVPA) ze wskazaniem mechanizmów działania na dwie linie glejaka - U-87 i U-251, (2) identyfikację rodzaju interakcji pomiędzy badanymi inhibitorami w działaniu przeciwnowotworowym, (3) ocenę aktywności cytotoksycznej i mechanizmu

Strona 1 z 5

działania związku WP1234, będącego pochodną 2-DG i maślanu oraz (4) sprawdzenie wpływu hipoksji na aktywność analizowanych inhibitorów.

W **Materiałach i metodach** Doktorantka bardzo szczegółowo opisała sposób wykonania badań, tłumacząc jednocześnie zasady działania poszczególnych testów. Opis świadczy o bardzo dobrej znajomości narzędzi badawczych niezbędnych do wykonania założonych celów. Rozdział ten, będący zbiorem różnych protokołów, może stanowić znakomity przewodnik dla innych naukowców, zajmujących się podobną tematyką badawczą.

Wyniki zostały przedstawione w sposób systematyczny i umożliwiający ich zrozumienie. W treść rozdziału wkomponowano liczne wykresy, tabele i zdjęcia, dokumentujące przeprowadzone badania. W toku prac, za pomocą wielu komplementarnych technik Doktorantce udało wykazać aktywność przeciwnowotworową badanych związków poprzez ocenę ich wpływu na wiele aspektów funkcji życiowych wybranych komórek nowotworowych. Zbadano żywotność komórek, proliferację, syntezę białek, produkcję kwasu mlekowego, syntezę ATP, indukcję apoptozy, aktywność deacetylaz histonowych, poziomy białek pro- i antyapoptotycznych, indukcję autofagii. Zrealizowane badania potwierdziły mechanizmy działania zastosowanych inhibitorów glikolizy i deacetylaz histonów. Analizowane związki indukowały śmierć komórek przede wszystkim na drodze apoptozy. Część testów wykonano w warunkach naśladujących hipoksję, lecz nie stwierdzono wpływu obniżenia poziomu tlenu na efekt cytotoksyczny zastosowanych inhibitorów. Dzięki transmisyjnej mikroskopii elektronowej zobrazowano również ultrastrukturę komórek nowotworowych i jako skutek aktywności badanych inhibitorów zaobserwowano kondensację mitochondriów oraz obecność wakuoli autofagowych. Skojarzone działanie inhibitorów glikolizy i deacetylaz histonów skutkowało pogłębieniem cytotoksyczności wobec komórek glejaka, co wskazywało na efekt synergistyczny. Badania nowego związku WP1234, hamującego jednocześnie glikolizę i deacetylazy histonów, wykazały jego skuteczność w zabijaniu linii komórek glejaka zgodnie z założonymi mechanizmami działania. Niedosyt budzi jedynie brak określenia aktywności analizowanych inhibitorów na materiale pierwotnym izolowanym z guzów glejaka wielopostaciowego, co w moim przekonaniu znacznie podniosłoby rangę przeprowadzonych badań.

W **Dyskusji** Doktorantka podsumowała uzyskane wyniki, odnosząc je również do osiągnięć innych badaczy, zajmujących się podobną tematyką. W mojej ocenie w rozdziale tym zawarto zbyt dużo informacji, które są przeglądem literatury naukowej i bardziej pasowałyby do Wstępu. Zabrakło mi przede wszystkim krytycznego podejścia do uzyskanych wyników, szczególnie w kontekście ograniczeń zastosowanego modelu *in vitro*, opierającego się na dwóch ustalonych liniach glejaka wielopostaciowego.

Rozprawę kończą cztery **wnioski**, które są poprawnie sformułowane i odpowiadają na wcześniej postawione cele.

Strona 2 z 5

Ostatni rozdział - **Piśmiennictwo** zawiera listę 322 cytowanych publikacji, która stanowi bardzo interesujący zbiór prac z tematyki rozprawy, pozwalający na poznanie aktualnego stanu wiedzy i skonfrontowanie wyników Doktoranta z tym, co do tej pory osiągnięto w obranym obszarze badawczym.

W mojej opinii praca doktorska mgr inż. Eweliny Siwiak-Niedbalskiej stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe, które dowodzi skuteczności przeciwnowotworowej nowych związków i nowatorskiej strategii walki z glejakiem wielopostaciowym. Oprócz dużej wartości naukowej pracy, rozprawa może być bardzo użyteczna od strony metodologicznej dla innych naukowców, zajmujących się charakterystyką substancji o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Niemniej jednak mam trochę pytań i uwag, które mają charakter redakcyjny i dyskusyjny, i nie wpływają na ocenę końcową pracy (wg kolejności występowania w tekście):

1. Str.19: Cytowanie nr 28 jest błędne. Jak się domyślam chodziło o pracę przeglądową nr 27. Dla udokumentowania przytaczanych wyników cytowanie prac oryginalnych a nie przeglądowych, jest bardziej właściwe.

2. Str. 36: W zdaniu „Szacuje się, że stężenia 2-DG uwalnianej w mózgu podczas przemian WP1122 jest 9-krotnie większe.” brakuje stwierdzenia, względem czego dokonywane jest porównanie.

3. Str. 44: Zdanie „Linia U-87MG to komórki pochodzenia epitelialnego, które rosną w postaci hodowli adherentnej.” nie jest prawdziwe. Komórki U-87MG mają epitelialną morfologię a nie pochodzenie.

4. Str. 45 (i kolejne): Prędkość wirowania powinna być wyrażana wartością „g” – w pracy często pojawiają się wartości rpm bez wskazania parametrów rotora.

5. Str. 48: Wyraz „stoki” nie powinien być stosowany – bardziej odpowiednie sformułowanie to „roztwory robocze”.

6. Str. 49: Czy pH było ustalane roztworem NaCl?

7. Str. 50: Sformułowanie „czynnik wielopłytek” jest niepoprawne – powinno być raczej „czynnik płytek wielodokłowych”.

8. Str. 50-51: Odnośnie testu SRB pada stwierdzenie, że „pozwala on na określenie liczby żywych komórek po traktowaniach czynnikami doświadczalnymi na podstawie pomiaru ilości związanej z białkami sulforodaminy (SRB), która ma zdolność elektrostatycznego wiązania się z białkami komórkowymi”. Napisano również, że „Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli (komórki nie traktowane czynnikami doświadczalnymi) jako % żywotności komórek kontrolnych (Ctrl)”. Czy test ten rzeczywiście umożliwia detekcję białek tylko w żywych komórkach i na tej podstawie wnioskuje się jedynie o liczbie żywych komórek/żywotności?.

Strona 3 z 5

9. Str. 52: Stwierdzono, że „płytki następnie 3x płukano buforem”. Nie wskazano, jakim buforem płukano płytki.

10. Str. 52: Nie jest jasne, w jaki sposób dokonywano detekcji BrdU. Napisano, że do dołków dodawano peroksydazę. Czy nie jest ona standardowo dołączana do drugorzędowego przeciwciała a dodaje się tylko substrat TMB?

11. Str. 52: Stwierdzono błędnie, że wyniki poziomu BrdU przedstawiano jako % żywotności komórek kontrolnych

12. Str. 59: We wszystkich analizach Western blot „intensywność otrzymanych prążków analizowano w odniesieniu do białka referencyjnego aktywny”. W jaki sposób przeprowadzono te analizy? W pracy nie zawarto żadnych wykresów densytometrycznych, natomiast przy ocenie wyników stosowano sformułowania o istotnie różnych poziomach ekspresji analizowanych białek.

13. Str. 60: W analizie rodzaju interakcji pomiędzy inhibitorami przytaczany jest parametr D_m , który jest definiowany w pracy jako „średnia skuteczna dawka, wartość IC_{50} , medialne stężenie inhibitora hamujące w 50% funkcje biologiczne i biochemiczne komórek”. Określenie „medialne stężenie” nie jest poprawne. D_m to po angielsku „median-effect dose”, czyli dawka/stężenie przy której uzyskuje się wartość będącą medianą.

14. Str. 61: We fragmencie dotyczącym analizy rodzaju interakcji poświęcono kilka zdań parametrowi „r” – współczynnikowi korelacji Pearsona (nie Parsona, jak napisano). W pracy nie pojawiają się żadne dane, dla których ten współczynnik byłby określony.

15. Str. 62 (i kolejne). Wszystkie wykresy nazwane są rysunkami. Bardziej odpowiednie byłoby użycie wyrazu „rycina”.

16. Str. 62 (i kolejne): Czemu wybrano cykloheksymid jako kontrolę efektu cytotoksycznego? Porównanie aktywności analizowanych inhibitorów względem związków stosowanych klinicznie pomogłoby ocenić ich użyteczność terapeutyczną.

17. Str. 62 (i kolejne): W jaki sposób przygotowywano roztwory cykloheksymidu i chlorochiny? Czemu służyła kontrola DMSO? W niektórych wynikach analiz pokazano kontrolę DMSO pomimo, że wykorzystywane związki były rozpuszczalne w wodzie, wg informacji z rozdziału Materiały i Metody (np. Rycina 30).

18. Str. 64: Dane uzyskane za pomocą testu SRB są interpretowane jako zahamowanie biosyntezy białek pod wpływem badanych inhibitorów. Czy obniżona ilość białek może być jedynie wynikiem zahamowania proliferacji komórek i ich mniejszej liczby w porównaniu do kontroli bez bezpośredniego wpływu na procesy produkcji białek?

19. Str. 67: W legendzie ryciny 20 napisano, że istotność statystyczna była określana w odniesieniu do kontroli, podczas gdy zaprezentowano porównania między warunkami normoksji i hipoksji dla różnych stężeń. Analogicznie dla rycin 27, 42 i 48 oraz 32 i 48 (przy porównaniach aktywności chlorochiny) a także w rycinach 35-38.

20. Str. 68-69: Czy wyniki poziomu mleczanu i ATP były normalizowane względem ilości komórek? Analizy żywotności i proliferacji sugerują, że po 72 h komórek nowotworowych było mniej wskutek działania badanych związków, więc niższe wartości stężeń mleczanu i ATP mogły wynikać nie z zahamowania glikolizy, ale z mniejszej liczby komórek użytych do przeprowadzenia testów.

21. Str. 83-86: Na rycinach zaprezentowano analizy statystyczne dla efektów skojarzonego działania inhibitorów w porównaniu do aktywności 2-DG i WP1122. Brak jest odniesień do efektów inhibitorów deacetylaz histonów użytych pojedynczo. Czy należy założyć, że nie było różnic istotnie statystycznych w tym wypadku i obserwowano tylko trendy?

22. Str. 88-89: W legendach przedstawionych tabel nie wyjaśniono jakie stężenia inhibitorów były stosowane – nie jest jasne co oznaczają zaprezentowane stosunki oraz parametry ED50, ED75 i ED90. Jak interpretować wartości D_m dla różnych ilościowo kombinacji inhibitorów? Dlaczego pojedyncze inhibitory mają różne wartości D_m i m w różnych pozycjach tabeli? O czym świadczy kształt krzywej dawka-odpowieź?

23. Str. 92: W tekście znajduje się odwołanie do wyników badań poziomu ATP pod wpływem WP1234, jednak tych danych nie zaprezentowano.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) i wnioskuję do Rady Naukowej Wojskowego Instytutu Medycyny Lotniczej o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Dr hab. Grzegorz Chodaczek

Laboratorium Bioobrazowania

Sieć Badawcza Łukasiewicz – PORT Polski Ośrodek Rozwoju Technologii

