



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Prof. dr hab. Aleksandra Klimczak,
Samodzielne Laboratorium Biologii Komórek
Macierzystych i Nowotworowych

Wrocław, 29 grudnia 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Eweliny Siwiak-Niezbalskiej

Temat rozprawy: „Ocena mechanizmów cytotoksycznego współdziałania inhibitorów glikolizy oraz inhibitorów deacetylaz histonów (HDAC) w modelu in vitro glejaka wielopostaciowego”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Eweliny Siwiak-Niezbalskiej wykonana została pod kierunkiem Pani dr hab. n. med. inż. Beaty Pająk, prof. WIHE, w Samodzielnej Pracowni Genetyki i Biologii Molekularnej, Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie. Promotorem pomocniczym niniejszej dysertacji jest Pani dr n. rol. Anna Jaśkiewicz.

Rozprawa została napisana w języku polskim, posiada układ typowy dla prac doktorskich tj. Streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzający w temat rozprawy Wstęp, jasno sformułowane Cele pracy, opisy stosowanych Materiałów i Metod, Wyniki, Dyskusję oraz Podsumowanie i Wnioski końcowe. Zamieszczony wykaz stosowanych skrótów poprzedzający Wstęp znakomicie ułatwia recenzję pracy. Jest to obszernie opracowanie, zawarte na 150 stronach, bogato ilustrowane, zawierające 50 rycin stanowiących wykresy, fotografie lub schematy oraz 10 tabel ułatwiających analizę uzyskanych wyników. Bogate piśmiennictwo liczy 322 pozycje. Na końcu dysertacji umieszczone zostały wykazy Tabel i Rycin.

Glejak wielopostaciowy (GBM) to wysoce inwazyjny guz ośrodkowego układu nerwowego o nie zbadanej do tej pory etiologii i braku skutecznych metod leczenia. Naciekający charakter nowotworu powoduje, że leczenie chirurgiczne wspomagane chemioterapią i/lub radioterapią nie jest wystarczająco efektywne. Ponadto, wybór możliwych do zastosowania chemioterapeutyków jest ograniczony z uwagi na brak zdolności przenikania przez barierę krew-mózg. Dynamiczny rozwój badań w obszarze terapii przeciwnowotworowych daje nadzieję na opracowanie nowych skutecznych metod leczenia glejaka wielopostaciowego w oparciu o terapię celowaną skierowaną w metabolizm glukozy tego nowotworu. Takiego



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

zadania podjęła się Doktorantka w ramach badań będących podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej, której celem było zbadanie efektywności zastosowania inhibitorów glikolizy oraz deacetylaz histonów (HDAC) w indukcji efektu cytotoksycznego w odniesieniu do linii komórkowych glejaka wielopostaciowego.

Praca stanowi istotny wkład w badaniach nad mechanizmami hamowania metabolizmu glukozy oraz zastosowania inhibitorów deacetylaz histonowych w modelu komórkowym glejaka wielopostaciowego, którego aktywność biologiczna związana jest zarówno z procesami glikolizy jak i nadekspresją deacetylaz histonów (HDAC) prowadzącą do nieprawidłowego wyciszenia wielu genów w tym genów odpowiadających za indukcję apoptozy.

Część doświadczalną rozprawy poprzedza obszerny **Wstęp** literaturowy, w którym Doktorantka przedstawiała aktualny stan wiedzy dotyczący epidemiologii, cech morfologicznych, diagnostyki oraz stosowanych obecnie terapii w leczeniu glejaka wielopostaciowego. Szczególną uwagę poświęciła metabolizmowi glukozy w komórkach nowotworowych i znaczeniu procesu glikolizy dla przeżycia komórek glejaka wielopostaciowego. Zahamowanie procesu glikolizy stanowi atrakcyjny cel terapeutyczny w leczeniu nowotworów a jednym z najlepiej poznanych inhibitorów tego procesu jest pochodna glukozy – 2-deoxy-D-glukoza (2-DG) i jej nowe pochodne, które są przedmiotem badań jako potencjalnych kandydatów na lek przeciwnowotworowy w terapii wysoce glikolitycznych guzów. Inną strategią eliminowania komórek nowotworowych jest hamowanie aktywności deacetylaz histonów (HDAC) mające na celu zahamowanie wzrostu, różnicowania oraz apoptozę komórek nowotworowych a wybrane związki tj. maślan sodu (NaBt) i sól sodowa kwasu walproinowego (NaVPA) były przedmiotem badań niniejszej dysertacji doktorskiej.

Należy podkreślić, że opisany na 25 stronach Wstęp, ilustrowany 11 rycinami, zawiera zasób informacji całkowicie wystarczający do dalszej analizy uzyskanych wyników pracy, ich interpretacji i następowych wniosków.

Cele pracy zostały jasno sformułowane, dotyczą badania możliwości eliminowania komórek glejaka wielopostaciowego poprzez jednoczesne zastosowanie inhibitorów glikolizy (2-DG i WP1122) oraz deacetylaz histonów (NaBt i NaVPA) w modelu *in vitro* linii komórkowych glejaka U-87 i U-251. Ponadto, zbadana została nowa pochodna 2-DG zawierająca podstawnik etylomaślanu (cząsteczka WP1234) pod kątem potencjału i mechanizmów cytotoksycznego oddziaływania na komórki glejaka.

Rozdział Materiały i Metody zawiera szczegółowe informacje dotyczące przeprowadzonych procedur niezbędnych do wykonania zadań badawczych. Lista opisanych procedur i badań jest adekwatna do weryfikacji założeń badawczych niniejszej rozprawy doktorskiej i wraz z



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKI HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

przedstawionymi wynikami nie pozostawia wątpliwości, że Doktorantka znakomicie opanowała warsztat badawczy w zakresie niezbędnym do oceny uzyskanych wyników.

W tej części pracy znalazły się uchybienia redakcyjne, które nie umniejszają wartości pracy, ale z uwagi na błędy literowe czy zastosowany styl językowy brzmią niezręcznie.

Np. w ocenie aktywności cytotoksycznej badanych związków chemicznych zastosowano metodę SRB, która jest testem do oceny proliferacji komórek w oparciu o pomiar zawartości białka komórkowego. Zatem podtytuł 3.7.2 „Pomiar natężenia biosyntezy białka z SRB” nie jest zbyt zręcznie wyrażony, korzystniejsze byłoby brzmienie „Pomiar efektywności biosyntezy białka testem SRB”.

Drugi komentarz dotyczy doboru warunków hipoksji indukowanej chemicznie. W celu indukcji zmian biochemicznych komórek w warunkach naśladujących hipoksję, komórki preinkubowano przez 4 h z dimetylooksaliloglicyną (DMOG) oraz Rodaminą 123, które indukowały aktywację czynnika HIF-1 α oraz intensyfikację procesu glikolizy. W jaki sposób wyznaczono stężenia DMOG i Rodaminy 123 do indukcji stanu hipoksji?

W organizmie człowieka hipoksja dotyczy wszystkich stanów wywołanych niedoborem tlenu we krwi tętniczej co prowadzi do upośledzenia procesów metabolicznych w obrębie tkanek i zwiększonej ekspresji białek związanych z hipoksją, w tym czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α . Czy rozważano eksperymenty w hipoksji wywołanej warunkami hodowli komórek tj. w obecności obniżonego poziomu tlenu np. do 1% O₂?

Wyniki. W rozdziale Wyniki Autorka starannie udokumentowała wyniki badań dotyczące efektywności cytotoksycznej badanych inhibitorów glikolizy: 2-DG i WP1122 oraz inhibitorów deacetylaz histonów (HDAC): maślan sodu (NaBt) i walproinian sodu (NaVPA) na komórki glejaka wielopostaciowego linii U-87 i U-251. Aktywność cytotoksyczna badanych związków zależna była od dawki i czasu ekspozycji i mierzona była obniżeniem żywotności, proliferacji i biosyntezy białek w komórkach GBM zarówno linii U-87 jak i U-251. Skuteczność hamowania procesu glikolizy w komórkach glejaka przez 2-DG i WP1122 została potwierdzona zależnym od dawki zahamowaniem syntezy kwasu mlekowego oraz ATP.

Ponadto, Doktorantka wykazała, że wrażliwość komórek na cytotoksyczne oddziaływanie badanych związków w warunkach naśladujących hipoksję nie była istotnie różna od cytotoksyczności uzyskanej warunkach normoksji, co świadczy o silnie glikolitycznym metabolizmie komórek GBM.

Analiza aktywności deacetylaz histonów potwierdziła, że NaBt i NaVPA, zależnie od dawki, hamują aktywność deacetylaz histonów, które zwiększają ekspresję białek proapoptotycznych Bad i Bax oraz obniżają ekspresję białka antyapoptotycznego Bcl-2, a wyniki te potwierdzają mechanizm działania analizowanych związków. W badaniu mechanizmu cytotoksyczności zastosowanych związków chemicznych Doktorantka wykazała, że inhibitory glikolizy 2-DG i



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

WP1122 oraz inhibitory deacetylaz histonów HDAC indukują cytotoksyczność komórek glejaka w mechanizmie związanym z procesem apoptozy a nie przy udziale procesu autofagii. Nasilenie efektu cytotoksycznego wyraźnie wzrastało po synergistycznym traktowaniu komórek GBM oboma związkami, które mają odmienny mechanizm działania. Mechanizm interakcji pomiędzy inhibitorami glikolizy i inhibitorami HDAC został potwierdzony analizą efektu mediany wg metody Chou-Talalay.

Kolejnym etapem było badanie nowej pochodnej 2-DG – WP1234, która łączy działanie inhibitorów glikolizy oraz inhibitorów HDAC. Doktorantka wykazała zdolność cząsteczki WP1234 do hamowania procesu glikolizy i obniżenia aktywności deacetylaz histonów co w efekcie prowadzi do synergistycznego efektu cytotoksycznego i indukcji apoptozy w komórkach glejaka. Jest to istotna obserwacja wskazująca na potencjał cytotoksyczny nowej pochodnej 2-DG – WP1234 w odniesieniu do komórek glejaka wielopostaciowego.

W tej części pracy proszę o wyjaśnienie analizy wyników apoptozy.

Rysunki 23 i 28 przedstawiają odsetek komórek apoptotycznych po zastosowaniu inhibitorów glikolizy i inhibitorów deacetylaz histonowych, odpowiednio. Użyty test do analizy komórek apoptotycznych, Aneksyna V + 7-AAD, pozwala na identyfikację komórek we wczesnym i późnym stadium apoptozy oraz komórek nekrotycznych. Które stadium apoptozy ilustrują ryciny przedstawiające odsetek komórek apoptotycznych? Ponadto, w opisie wyników dotyczących apoptozy pojawiło się zdanie „Jak wskazuje Rysunek 23, zmniejszenie żywotności, proliferacji, natężenia syntezy białek oraz syntezy ATP w komórkach U-87 i U-251 korelowało ze wzrostem odsetka komórek apoptotycznych wybarwionych aneksyną V”. Jest to niezręczność w interpretacji wyników gdyż Rysunki 23 i 28 przedstawiają odsetek komórek apoptotycznych po zastosowaniu inhibitorów glikolizy i inhibitorów deacetylaz histonowych, odpowiednio, a nie korelację z wymienionymi w powyższym zdaniu procesami biologicznymi.

W pracy pojawiły się też niedoskonałości językowe i edytorskie:

Str. 69. „...ilość ATP...” powinno być „...poziom ATP...”

Str. 50, 70, 75. Wyrażenia „...natężenia biosyntezy białka...” „...natężenia syntezy białek...” są niezręczne, korzystniej byłoby użycie sformułowania „...efektywność syntezy białek...”.

Wspomniana niezręczność interpretacyjna i niedoskonałości językowe czy edytorskie nie umniejszają efektów wykonanych badań a różnorodność zastosowanych metod analizy *in vitro* sprawia, że wyniki niniejszej dysertacji są bardzo dobrze udokumentowane i nie budzą wątpliwości.

Dyskusja. Dogłębna dyskusja świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnień dotyczących biologicznej aktywności komórek nowotworowych, w tym glejaka wielopostaciowego, i znajomości procesów biologicznych, które można wykorzystać jako cele terapeutyczne w leczeniu nowotworów. Doktorantka wskazała możliwości i ograniczenia zastosowania różnych



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

leków i kandydatów na lek w leczeniu glejaka wielopostaciowego i w sposób krytyczny dokonała przejrzystej analizy i interpretacji uzyskanych wyników na tle bogatego piśmiennictwa w większości opublikowanego w ostatnich latach.

Wnioski wynikające z podsumowanych wyników stanowią wyczerpującą odpowiedź na postawione cele i zadania badawcze.

W podsumowaniu chciałabym podkreślić, że przedstawione badania zostały dobrze zaprojektowane, zastosowano odpowiednie metody badawcze, przeprowadzono prawidłową analizę danych i interpretację wyników. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Eweliny Siwiak-Niedbalskiej stanowi oryginalne i nowatorskie osiągnięcie naukowe. Uzyskane wyniki wskazują, że koncepcja synergistycznej terapii polegającej na jednoczesnym hamowaniu procesu glikolizy oraz modulowaniu zmian transkrypcji genów pro-/antyapoptotycznych poprzez zahamowanie aktywności deacetylaz histonów, zwiększa potencjał cytotoksyczny obu grup inhibitorów i skuteczniej eliminuje komórki nowotworowe glejaka wielopostaciowego. Poddana recenzji dysertacja doktorska ma duże znaczenie poznawcze o charakterze aplikacyjnym a jej wyniki mogą wyznaczać kierunek rozwoju badań kandydatów na leki i stanowić podstawę opracowania protokołu terapeutycznego w leczeniu glejaka wielopostaciowego i innych nowotworów zależnych od metabolizmu glukozy.

Z uwagi na wysoką wartość poznawczą wyników niniejszej rozprawy doktorskiej oraz wnikliwe opracowanie wielowątkowego materiału badawczego wnoszę o wyróżnienie przedstawionej dysertacji doktorskiej stosowną nagrodą.

Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Eweliny Siwiak-Niedbalskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.), stawiane rozprawom na stopień doktora, tym samym wnioskuje do Rady Naukowej Wojskowego Instytutu Medycyny Lotniczej w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Eweliny Siwiak-Niedbalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Laboratorium Biologii Komórek
Macierzystych i Nowotworowych

Prof. dr hab. Aleksandra Klimczak