

Kraków, 23.11.2022 r.



**OCENA ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH
PANI MGR INŻ. MAI SOŁTYKI ZATYTUŁOWANEJ:
"ANALIZA PORÓWNAWCZA CYTOTOKSYCZNEGO ODDZIAŁYWANIA
POCHODNYCH 2-DEOKSY-D-GLUKOZY(2-DG)
W MODELU IN VITRO GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO"**

Glejak wielopostaciowy (GBM, *glioblastoma multiforme*) należy do pierwotnych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego o bardzo dużym stopniu złośliwości. Mimo dużego postępu w badaniach, wyniki leczenia tego nowotworu pozostają niezadowolające. Wciąż konieczne są badania podstawowe ukierunkowane na poznanie molekularnych mechanizmów prowadzących do jego rozwoju, a także testowanie związków o potencjalnym działaniu terapeutycznym. Takie zadanie postawiła sobie Doktorantka, Pani mgr inż. Maja Sołtyka, realizując pracę doktorską w Samodzielnej Pracowni Genetyki i Biologii Molekularnej w Wojskowym Instytucie Higieny i Epidemiologii w Warszawie pod opieką dr hab. n. med. inż. Beaty Pająk, prof. WIHE (promotor) oraz dr n. fiz. Marcina Ziemniaka z Laboratorium Badań Strukturalnych i Biochemicznych, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego (promotor pomocniczy).

Badania te wpisują się w główny nurt badawczy Zespołu kierowanego przez dr hab. Beatę Pająk i są wynikiem realizacji kierowanego przez nią projektu OPUS NCN „Molekularne i farmakologiczne podstawy działania inhibitorów glikolizy jako czynników przełamujących lekooporność glejaka”.

Formalny opis rozprawy

Praca jest napisana w klasyczny sposób, liczy 151 stron i podzielona jest na podrozdziały, typowe dla tego typu rozpraw. Po krótkim Streszczeniu i angielskojęzycznej wersji (Summary), kolejne rozdziały to Wykaz skrótów, Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja i Wnioski. Pracę zamyka rozdział Piśmiennictwo składający się z 287 pozycji a na końcu rozprawy Doktorantka przedstawiła Wykaz Rycin oraz Tabel.

Praca jest napisana poprawnym językiem polskim, choć Autorka nie ustrzegła się (nielicznych) błędów literowych, interpunkcyjnych, stylistycznych czy zapożyczeń (kalek) z języka angielskiego (np. pelet – osad, kit – zestaw, starter przedni i wsteczny a nie forward i reverse).

Ocena merytoryczna rozprawy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi przemyślaną pracę, w której Doktorantka w przejrzysty sposób nakreśliła aktualną wiedzę na temat patologii glejaka, przeprowadziła dobrze zaplanowane doświadczenia a na podstawie ich wyników, sprecyzowała wnioski, odpowiadające postawionym założeniom pracy.

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii
Zakład Biotechnologii
Medycznej

dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6412
fax. +48 12 664 6918
agnieszka.loboda@uj.edu.pl
<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm>

Streszczenie prawidłowo podsumowuje rozprawę, przedstawia główny problem badawczy oraz skrótowo prezentuje wyniki. Do tej części mam drobną uwagę edytorską, dotyczącą braku rozwinięcia niektórych skrótów (np. GBM, HKII).

Wykaz skrótów jest kompletny i w większości przygotowany prawidłowo. W wyjątkowych sytuacjach podano jedynie angielskojęzyczne tłumaczenie (np. AML, HEPES, MTS, PDH). Drobne pomyłki wkrały się w rozwinięciu np. skrótu MDR (oporność a nie odporność wielolekowa), a SDS to siarczan dodecyłu, sól sodowa albo siarczan dodecyłu sodu a nie siarczan dodecyłu.

W dobrze napisanym, dość obszernym **Wstępie**, zawartym na 24 stronach i podzielonym na 6 podrozdziałów, zilustrowanym 10 rycinami i 1 tabelą, Pani mgr inż. Sołtyka skoncentrowała się na charakterystyce komórek nowotworowych glejaka wielopostaciowego, przede wszystkim ich metabolizmie oraz przedstawieniu możliwych opcji terapeutycznych wykorzystujących inhibitory glikolizy, w tym halogenopochodnych 2-deoksy-D-glukozy (2-DG). Lektura tej części pracy wskazuje, że Doktorantka biegle orientuje się w tematyce przedmiotu. Wstęp jest napisany w przejrzysty sposób, przedstawia najważniejsze i najnowsze doniesienia w zakresie możliwości terapeutycznych glejaka, opartych na wykorzystaniu pochodnych 2-DG. Tekst czyta się dobrze, choć Autorka nie ustrzegła się drobnych skrótów myślowych czy potknięć językowych (np. strona 26: „HK II wiąże się z mitochondriami” oraz dalej „odporność na chemioterapeutyki”). Niezależnie od tego, uważam, że ta część dobrze wprowadza czytelnika do lektury dalszych części rozprawy.

Cel pracy jest prawidłowo nakreślony. Doktorantka podjęła się analizy cytotoksycznego oddziaływania nowych pochodnych 2-DG, zsyntetyzowanych w ramach współpracy naukowej w laboratorium prof. Priebe (MD Anderson Cancer Center, Teksas, USA) oraz identyfikacji molekularnych mechanizmów ich działania w komórkach glejaka wielopostaciowego linii U-251 i U-87. Dodatkowo, Doktorantka sformułowała cztery szczegółowe cele badawcze, które stanowiły podstawę do przeprowadzenia dobrze zaplanowanych badań.

Kolejny rozdział to **Materiały i metody**, w którym w drobiazgowy sposób opisano procedury przeprowadzonych doświadczeń. Doktorantka dołożyła wszelkich starań, aby w wyczerpujący sposób przedstawić szczegóły metodologiczne kolejnych analiz, w tym hodowli komórkowych, stymulacji komórek badanymi związkami, testów biochemicznych, analizy ekspresji białek z użyciem metody Western blot. W swoich badaniach, Pani mgr inż. Sołtyka podjęła też próbę produkcji i krystalizacji białka ludzkiej heksokinazy II i szczegółowo opisała kolejne etapy tych procedur. Ta część rozprawy została zobrazowana jedną ryciną przedstawiającą struktury chemiczne badanych związków (w podpisie tej ryciny wkrał się błąd – to rycina 11 a nie 41). Należy podkreślić, że część badań została wykonana we współpracy z innymi grupami/innymi jednostkami, ale zostało to odpowiednio podkreślone w opisie danej metody.

Moje drobne uwagi do tej części pracy nie mają charakteru merytorycznego, a dotyczą raczej sposobu prezentacji pewnych treści. Szkoda, że Autorka nie podała numerów katalogowych przeciwiały używanych w analizie Western blot, nazwa firmy to Thermo Fisher Scientific a nie Thermo Fisher (używane w pracy zamiennie). Uważam też, że podawanie szczegółów adresowych firm jest dobrą praktyką, choć informacje te mogłyby pojawiać się tylko przy pierwszym wspomnieniu o danej firmie. Nie zgodzę się,



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbnr>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

dr hab. Agnieszka Łoboda

że jak napisała Doktorantka na str. 52 „Przeciwciała kaspazy-3 służą jako doskonałe biomarkery do monitorowania indukcji apoptozy”. Pani mgr inż. Sołytko w tej części pisze o genie HK21, proszę o dokładną informację, co to za gen. Powyższe komentarze nie rzutują na wysoką ocenę rozdziału Materiały i metody. Co najważniejsze, dobór metod i przeprowadzone analizy pozwoliły na realizację głównych celów projektu.

Część prezentująca **Wyniki** mieści się na prawie 40 stronach i została podzielona na dwa główne podrozdziały, tj. pierwszy prezentujący wyniki badań *in vitro* oraz drugi, skupiający się na opisie przeprowadzonych badań biochemicznych i fizykochemicznych. Ta część jest bardzo dobrze opracowana i zilustrowana 24 panelowymi rycinami. Rysunki są czytelne, zawierają wyczerpujące opisy, a przede wszystkim prawidłową analizę statystyczną. Autorka przeprowadziła szereg doświadczeń na dwóch liniach komórkowych gęsi, stymulując je 11 różnymi związkami (2-DG, WP1122, 2-FG, 2-FM, 2-IG, 2-IM, 2-CG, 2-CM, 2-BG, 2-BM oraz 2,2-diFG). W zależności od typu doświadczenia, badane związki były stosowane w różnym zakresie stężeń. Doktorantka przeprowadziła badania nie tylko w warunkach normoksji, ale też symulowanej hipoksji (stymulacja komórek związkiem DMOG, hamującym hydroksylazy prolinowe, co prowadzi do aktywacji czynnika HIF-1 α). Kolejno badała wpływ związków na proliferację komórek, proces apoptozy, autofagii, glikolizy czy aktywność HK II. Badania te wymagały dużego nakładu czasu i sił. Wykazała m.in., że rodzaj podstawnika czy zmiany strukturalne związków istotnie wpływają na ich aktywność biologiczną a najwyższy potencjał przeciwnowotworowy wykazują fluoropochodne oraz acetylowana pochodna 2-DG - WP1122.

Do tej części mam kilka uwag edytorskich, które pozwalam sobie wypisać, z myślą o tym, że może to pomóc Doktorantce np. przy przygotowywaniu wyników do publikacji.

- Większość wykresów jako opis osi Y podaje procent kontroli (np. żywotność, proliferacja, synteza białka itd.), ale wyniki te są przedstawione w sposób znormalizowany do 1. Przy takim opisie osi, wyniki powinny być przedstawione w procentach.
- Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku Ryciny 20, gdzie opis osi wskazuje, że wyniki pokazują produkcję NADH w nmol/mg, co nie jest w rzeczywistości pokazane na wykresach (wyniki normalizowane do komórek kontrolnych – kontrola =1).

Mam również kilka pytań/sugestii dotyczących samych eksperymentów:

- Czy wszystkie badane związki były rozpuszczone w wodzie/medium?
- W badaniach używano związku DMOG, analiza Ryc. 14 pokazuje, że indukcja poziomu czynnika HIF-1 oraz zależnych od jego aktywności białek nie jest zbyt wysoka. Zastosowane stężenia DMOG były stosunkowo niskie, czy nie warto byłoby użyć wyższych stężeń? Jeszcze lepszym rozwiązaniem mogłoby być kilkukrotne podawanie DMOG, lepiej imitujące ciągłą aktywację HIF-1 α w warunkach hipoksji.
- Do badania wpływu związków na żywotność, Doktorantka używała testu MTS, mierzącego aktywność dehydrogenaz mitochondrialnych. Nie jest to idealna metoda do pomiaru żywotności komórek. Jakie inne (lepsze) rozwiązania można zaproponować?

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm>

4. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, czy nie warto rozważyć przeprowadzenia szerszego zakresu badań dotyczących wpływu badanych związków na proces mitofagii?

Druga część pracy koncentruje się na opisie wyników badań biochemicznych i fizykochemicznych obejmujących, m.in. produkcję rekombinowanego białka heksokinazy II i jego krystalizację. Pomimo wysiłków, nie udało się uzyskać odpowiedniej jakości kryształów, które mogłyby być użyte do dalszych badań. Wynik ten na pewno rozczarował Doktorantkę, jednak Recenzentka zdaje sobie sprawę, z tego, że procedura krystalizacji jest niezwykle trudna i „chimeryczna”.

W końcowej części rozprawy przedstawiono **Dyskusję**, w której przeanalizowano uzyskane wyniki na tle literatury przedmiotu. Doktorantka opisuje zalety pochodnych 2-DG, wskazując również na pewne ograniczenia w ich zastosowaniu. Ciekawym fragmentem jest ten opisujący potencjalne mechanizmy odpowiedzialne za zróżnicowaną odpowiedź komórek linii U-87 i U-251 na stymulację badanymi czynnikami. Cała dyskusja jest napisana w bardzo dobry sposób, Doktorantka ze swobodą interpretuje swoje wyniki. Cytuje wiele nowych i najnowszych publikacji. Pracę zamykają cztery dobrze sformułowane konkluzje.

Wyniki uzyskane w ramach pracy są zdecydowanie wartościowe i pozwalają na postawienie wielu pytań i zaplanowania nowych eksperymentów. Na koniec, z obowiązku recenzenta i chęci rozmowy z Doktorantką podczas publicznej obrony, proszę o krótkie nakreślenie możliwości dalszych badań, w tym analiz *in vivo*. Jakiego typu doświadczenia można zaproponować? Czy do badania *in vivo* lepszym rozwiązaniem jest monoterapia z wykorzystaniem pochodnych 2-DG czy terapia skojarzona?

Podsumowanie

Stwierdzam, iż uzyskane przez Panią mgr inż. Maię Sołtykę wyniki są ważne i poszerzają wiedzę nad patologią złośliwych nowotworów mózgu i mogą przyczynić się do opracowania nowych terapii tej choroby.

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 stanowi dowód na posiadaną przez Doktorantkę wiedzę teoretyczną i praktyczną znajomość technik metod biologii molekularnej niezbędnych do prowadzenia pracy badawczej.

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Wojskowego Instytutu Medycyny Lotniczej o dopuszczenie Pani mgr inż. Mai Sołtyki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,



Agnieszka Łoboda



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm>