



Warszawa, 23.12.2022 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr inż. Maji Sołtyki

pt. „Analiza porównawcza cytotoksycznego oddziaływania pochodnych 2-deoksy-D-glukozy (2-DG) w modeli *in vitro* glejaka wielopostaciowego”

Praca doktorska pani Maji Sołtyki dotyczy bardzo ważnego zagadnienia, jakim jest poszukiwanie i charakteryzowanie nowych potencjalnych związków antynowotworowych. Celem pracy była analiza efektów biologicznych, molekularnego mechanizmu oddziaływania oraz znaczenia położenia podstawnika w nowych halogenopodobnych 2-DG (2-FG, 2-IG, 2-CG, 2-BG) oraz acetylowanej pochodnej 2-DG, WP1122, w modelu *in vitro* glejaka wielopostaciowego. Ponadto, celem przeprowadzonych badań była analiza wpływu pochodnych 2-DG na aktywność HK II, a także otrzymanie rekombinowanego białka ludzkiej HK II w systemie bakteryjnym i jego krystalizacji z oddziałującymi halogenopochodnymi.

W ostatnich 20 latach nastąpił prawdziwy przełom w zakresie opracowywania nowych terapii antynowotworowych. Opracowano wiele nowych cząsteczek, np. przeciwciała monoklonalne, inhibitory kinaz, inhibitory punktów kontrolnych, a także powstało wiele nowych technologii, np. ADC, czy terapie komórkowe. W efekcie doprowadziło to do powstania nowych programów leczenia. W ciągu ostatnich kilku lat zarejestrowano ponad 60 nowych terapii onkologicznych – większość jednak w nowotworach hematologicznych i chłoniakach. Pomimo wspomnianych sukcesów, w leczeniu guzów litych i przerzutów nowotworowych wciąż nie ma żadnego postępu. Guzy mózgu, a szczególnie glejaki to jedne z najtrudniejszych nowotworów pod kątem leczenia i rokowania u pacjentów. Glejak jest najczęściej diagnozowanym guzem mózgu, stanowiąc ok. 60% przypadków. Wykrywany jest u ponad 17 tys. pacjentów rocznie w USA, stanowiąc około 2% wszystkich diagnozowanych nowotworów. Mniej więcej tyle samo pacjentów rocznie na ten nowotwór w USA umiera. Najczęściej rozpoznane jest u pacjentów w wieku 55-60 lat, czyli aktywnych zawodowo z dużym bagażem doświadczenia. Ich zgony stanowią więc istotny problem społeczny. Aktualnie średnia przeżywalność od momentu rozpoznania to 15-



18 miesięcy i nie ma tu znaczenia czy pacjent ma dostęp do najnowszych rozwiązań terapeutycznych (przykładem może być tu senator John McCain). Pięcioletnia przeżywalność wynosi od 5% do 10% (dla porównania dla raka piersi jest to prawie 90%), co obok raka trzustki stawia ten nowotwór na czele najtrudniejszych guzów do leczenia. Wczesne rozpoznanie nie zmienia tej statystyki. Głównymi problemami w leczeniu tego nowotworu są: bariera krew-mózg ograniczająca dostęp niektórych rozwiązań terapeutycznych, nieostre granice guza ograniczające możliwość interwencji chirurgicznej, czy też wrażliwość zdrowych komórek mózgu na stosowane terapie i wynikająca stąd toksyczność.

W ostatnich latach nastąpił wzrost liczby badań nad glejakiem, co wiązało się z nadzieją, że wreszcie nastąpi przełom w leczeniu. Niestety do przełomu nie doszło. W 2019 roku firma Abbvie wstrzymała badania z wykorzystaniem technologii ADC (Depatux-M) nie uzyskując zadowalających rezultatów przeżywalności pacjentów (tylko 15 miesięcy). Podobnie, w tym samym roku firma BMS także doniosła o porażce badania klinicznego Optivo w kombinacji z radioterapią (a poprzednio w 2017, kiedy Optivo było stosowane w monoterapii). Tecentriq firmy Roche nie przeszedł nawet pierwszej fazy badań klinicznych w tym wskazaniu.

Aktualnie trwają próby leczenia glejaków z wykorzystaniem innych rozwiązań, które sprawdziły się np. w nowotworach hematologicznych, szczególnie CAR-T. Nie ma jednak przekonujących danych wskazujących, że terapia jest skuteczna. Innym ciekawym, i wydaje się, że dość obiecującym podejściem w leczeniu guzów mózgu jest wykorzystanie wirusów (Ziopharm Oncology), które mogą przechodzić przez barierę krew-mózg. Wszystkie te badania są jednak jeszcze na wczesnych etapach. Nadal standardem leczenia pozostaje radioterapia plus temozolomid z niską efektywnością. W przypadku wznowy glejaka, nie ma nawet powszechnego standardu postępowania. Stosuje się zazwyczaj lomustynę i regorafenib.

Dlatego też badania nad poszukiwaniem nowych możliwości terapeutycznych w glejaku są tak niezwykle ważne i potrzebne. W potrzebę tę doskonale wpisują się badania przeprowadzone przez panią Maję Sołtykę i recenzowana praca. Moja pierwsza uwaga odnosi się do tytułu pracy, a w zasadzie nazewnictwa wynikającego z klasyfikacji glejaków. Pani Maja używa terminu „*glioblastoma multiforme*”, a w języku polskim „glejaka wielopostaciowego” (skrót GBM). Taka nomenklatura była aktualna do roku 2021, kiedy to WHO zmieniło klasyfikację nowotworów



mózgu i obecnie stosuje się nazwę „*glioblastoma*” (skrót GBM). W języku polskim „glejaka wielopastociowego” zamieniono pojęciem „glejak IV stopnia” (za: *WHO CNS5 2021 classification of gliomas*). Przypuszczam, że tytuł pracy był ustalony przez zmianą klasyfikacji przez WHO i na późniejszych etapach nie został on zaktualizowany. Warto moim zdaniem jednak o tym pamiętać przy opracowywaniu publikacji naukowej na podstawie wyników otrzymanych w ramach niniejszej pracy.

Układ przedstawionej do recenzji pracy i kolejność rozdziałów są typowe dla prac doktorskich, kolejność poruszanych zagadnień logiczna i przejrzysta. Całość pracy jest napisana poprawnym językiem. Układ graficzny pracy jest elegancki. Zamieszczone ryciny i tabele są przejrzyste i czytelne.

We wstępie pracy Autorka przedstawia charakterystykę glejaka, opisuje mutacje w poszczególnych genach, a także obraz histopatologiczny tego nowotworu. W tym opisie przydałoby się jednak nawiązać do aktualnej, wspomnianej już klasyfikacji WHO. Następnie, Autorka opisuje metabolizm komórek nowotworowych, skupiając się na glikolizie tlenowej, znaczeniu heksokinazy w matabolizmie glukozy oraz opisie inhibitorów glikolizy w terapii przeciwnowotworowej. Szczególną uwagę poświęciła halogenopochodnym 2-DG, co jest logiczne z punktu widzenia tematyki pracy i jej celu. Na podstawie wstępu pracy można odnieść wrażenie, że pani Maja ma bogatą wiedzę w zakresie tematyki swojej pracy.

Kolejnym rozdziałem jest opis celu pracy – przedstawiony bardzo przejrzysto. Autorka postawiła sobie cel główny: Analiza porównawcza cytotoksycznego oddziaływania nowych halogenopochodnych 2-DG (2-FG, 2,2-diFG, 2-IG, 2-BG, 2-CG) oraz identyfikacja molekularnych mechanizmów ich oddziaływania w komórkach glejaka linii U-251 i U-87. W osiągnięciu tego celu miały pomóc cztery logicznie postawione cele szczegółowe: (1) Identyfikacja pochodnych 2-DG o najwyższym potencjale przeciwnowotworowym, (2) Analiza znaczenia położenia podstawnika halogenowego przy węglu C2 w strukturze halogenopochodnych glukozy i mannozy dla efektów ich oddziaływania, (3) Ocena hamowania efektywności heksokinazy II przez pochodne 2-DG, (4) Próba uzyskania rekombinowanego białka heksokinazy II oraz jego krystalizacja wraz z oddziałującą halogenopochodną w celu oceny różnic w interakcji z enzymem w zależności od rodzaju halopodstawnika, które były sukcesywnie realizowane.



Rozdział materiały i metody jest opisany w dość dokładny sposób. Swoboda w opisie stosowanych technik badawczych świadczy o bardzo dobrym ich opanowaniu przez Doktorantkę. Brakuje mi informacji na temat liczby powtórzeń biologicznych i technicznych każdego eksperymentu (takiej informacji nie sposób znaleźć ani w rozdziale materiały i metody, ani w opisach rycin). Brakuje też kilku wyjaśnień, np. dlaczego badania prowadzono po 72 godzinach – dlaczego zdecydowano się na taki, a nie inny punkt czasowy? Czy wynika on z charakterystyki procesu zachodzącego w komórce, parametrów badanego związku, czy może wytypowano go na podstawie badań wstępnych? Mam też uwagę techniczną do eksperymentów badania apoptozy. Może warto było zebrać do analizy nie tylko komórki adherentne, ale też komórki z pożywki, co z pewnością wiązałoby się z obserwacją większego odsetka komórek apoptotycznych. W eksperymencie przeprowadzonym wg. protokołu Doktorantki z pewnością wiele komórek apoptotycznych zwyczajnie odplukano. Zwracam uwagę na ten element, gdyż wzrost liczby komórek apoptotycznych po zastosowaniu badanych związków nie był imponujący i warto się zastanowić z czego to może wynikać. Może było to związane właśnie z protokołem eksperymentu, a może warto było jednak wybrać inny punkt czasowy, np. 24 godziny lub 48 godzin?

Wyniki pracy zostały opisane bardzo starannie, logicznie i Doktorantka przedstawiła je w elegancji sposób. Mam jednak do tego działu kilka uwag. W eksperymentach badania apoptozy, autofagii, natężenia procesu glikolizy, czy wpływu pochodnych 2-DG na aktywność HK II brakuje mi jednak zastosowania kontroli pozytywnej. We wszystkich tych eksperymentach użyto jedynie kontroli negatywnej (tj. komórki nietraktowane lub traktowane tylko DMSO). Warto moim zdaniem uzupełnić te wyniki podczas przygotowywania publikacji. Pod rycinami brakuje informacji, jaki test statystyczny zastosowano do analizy wyników prezentowanych na tym konkretnym wykresie. Na Rycinie 15 brakuje z kolei panelu wykresów „A” tj. wykresów dla związków 2-DG i WP1122. Wyniki dla tych związków są omawiane w tekście, ale nie sposób znaleźć tych wyników na rycinie.

Te wskazane powyżej niedociągnięcia nie umniejszają jednak wartości uzyskanych wyników. Warto podkreślić interdyscyplinarność pracy, w której wykorzystano bardzo wiele metod zarówno biologii molekularnej, jak i metod biochemicznych czy biofizycznych. Produkcja rekombinowanego białka, szczególnie przy niskiej wydajności i problemach z jego odzyskiem, a



następnie analiza krystalograficzna to zajęcie bardzo praco- i czaso-chłonne. Wielkie brawa dla Doktorantki, że zdołała te wszystkie zadania wykonać, szczególnie że praca była realizowana w czasie wielu ograniczeń związanych z pandemią i lockdown`ami.

Ostatni element pracy to Dyskusja własnych wyników z informacjami z literatury. Doktorantka uwzględnia najnowsze publikacje innych autorów, zwłaszcza te które ukazały się podczas realizacji tej pracy. Dyskusja jest krótka, ale konkretna, dojrzała i profesjonalna. Jedyne, czego mi zabrakło w rozdziale opisującym różnice pomiędzy wykorzystanymi w pracy liniami komórkowymi, to nawiązanie do kontrowersji związanych z linią U-87 (Marie Allen i wsp. Sci Transl Med. 2016, 8 (354)), które sprawiają, że w niektórych leboratoriach wycofano się z jej stosowania.

Reasumując, praca zawiera dużą ilość ciekawych wyników, a sposób ich przedstawienia świadczy o swobodzie poruszania się w zagadnieniach naukowych i umiejętności rozwiązywania problemów doświadczalnych. Doktorantka osiągnęła zakładane cele. Wnioski wynikające z rozprawy stanowią oryginalny wkład Autorki w rozwój dyscypliny naukowej.

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Maji Sołtyki 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.) i wnioskuję do Rady Naukowej Wojskowego Instytutu Medycyny Lotniczej o dopuszczenie mgr Maji Sołtyki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuję także o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą, zgodnie z zasadami wewnętrznymi.

Szkoła Główna Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie
Instytut Biologii
Samodzielna Pracownia Biologii
Nowotworu
ul. Jana Ciszewskiego 8
02-786 Warszawa
spbn@sggw.edu.pl
www.sggw.edu.pl

prof. dr hab. Magdalena Król