



Dr hab. Hanna Pruchnik, profesor UPWr

Wrocław, 13.03.2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Anny Marii Kubickiej

pt.: Ocena aktywności przeciwnowotworowej nowych inhibitorów heksokinazy II

Praca doktorska mgr Anny Kubickiej została wykonana w Katedrze Biofizyki Medycznej Instytutu Biofizyki na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Łabieniec-Watały oraz promotorki pomocniczej dr Karoliny Matczak. Część badań opisanych w dysertacji była przeprowadzona w ramach współpracy z Katedrą Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii Politechniki Śląskiej oraz z doktorem Horacio Pérez-Sánchez z Katolickiego Uniwersytetu San Antonio w Murcji (Hiszpania).

Zasadność tematu rozprawy

Nowotwory są wciąż jedną z głównych przyczyn śmierci ludzi na całym świecie. Z powodu starzenia się społeczeństwa, zmian w stylu życia, liczba zachorowań stale wzrasta. Nowotwory są chorobami bardzo złożonymi, w których bierze udział wiele czynników genetycznych, środowiskowych i immunologicznych, dlatego ważne jest zrozumienie mechanizmów ich powstawania oraz rozwoju, aby móc opracować skuteczne metody leczenia. Konieczne jest rozwijanie i doskonalenie terapii onkologicznych, w tym testowanie nowych związków jako potencjalnych leków o specyficznym działaniu i niskiej toksyczności względem komórek prawidłowych. Przedstawiona do recenzji rozprawa magister Anny Kubickiej doskonale wpisuje się w nurt badań z zakresu nauk biologicznych ukierunkowany na wykorzystanie różnic metabolicznych między komórkami prawidłowymi i nowotworowymi jako potencjalnego sposobu uzyskania selektywności terapeutycznej. Badania zrealizowane w ramach niniejszej pracy dotyczą aktualnych i istotnych zagadnień związanych z możliwościami wykorzystania nowych inhibitorów heksokinazy II (HKII) jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Inhibitory



HKII mogą być skuteczną strategią terapeutyczną, ponieważ hamowanie tego enzymu może zaburzyć metabolizm glukozy w komórkach nowotworowych. Wybór tematu badawczego jest jak najbardziej zasadny i adekwatny.

Ocena pracy doktorskiej

Mgr Anna Kubicka przygotowała rozprawę doktorską w formie monografii (170 stron), której struktura jest charakterystyczna dla empirycznych prac naukowych. Mamy wyodrębnione wprowadzenie teoretyczne (I-III) oraz część doświadczalną (IV). Manuskrypt został podzielony na 13 rozdziałów, wśród których znajdziemy: *Materiały, Etapy pracy, Metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski*, streszczenie w języku polskim i podsumowanie w języku angielskim oraz spis literatury. Rozprawę uzupełnia, dołączony na początku manuskryptu, *Wykaz stosowanych skrótów*. Ponadto, jako rozdział 9, przedstawiono *Analizę SWOT w kontekście zastosowania inhibitorów HKII w leczeniu nowotworów*. Pewną niekonsekwencją w spisie poszczególnych rozdziałów jest stosowanie numeracji rzymskiej i arabskiej. Generalnie podział treści jest poprawny i zgodnie z zasadami opracowania prac naukowych najwięcej miejsca mgr Anna Kubicka przeznaczyła na przedstawienie i interpretację wyników badań własnych.

We *Wstępie* Doktorantka podaje cechy i właściwości charakterystyczne dla nowotworów, nakreśla rozwój i współczesne kierunki badań w terapii przeciwnowotworowej. W szczególności zwraca uwagę na zmieniony metabolizm komórek nowotworowych i możliwość zastosowania zupełnie nowych narzędzi, za pomocą których można byłoby zahamować działanie specyficznych enzymów, np. heksokinazy II. Dokładne omówienie metabolizmu komórkowego wraz z rozwojem badań w tym temacie zostało opisane w rozdziale pierwszym (I). Doktorantka wskazuje aspekty metabolicznego przeprogramowania nowotworów. Na dołączonych schematach (Ryc. 2, Ryc. 3) przedstawia różnice między oddychaniem tlenowym a glikolizą tlenową w komórkach prawidłowych i nowotworowych oraz zestawia metaboliczne powiązania – zależności zachodzące w komórkach nowotworowych. Opisuje znacznie heksokinaz, w szczególności rolę heksokinazy II w metabolizmie nowotworów wątrobowokomórkowych, których przyczyny powstania oraz metody leczenia są zebrane w odrębnym rozdziale drugim. Doktorantka szeroko omawia/dyskutuje metody doświadczalne i wirtualne stosowane w badaniach metabolizmu komórkowego, podaje ich wady oraz zalety jak również ograniczenia występujące w praktyce. Te



fragmenty zawierają szereg interesujących aczkolwiek trochę zaskakujących uwag: „*W czasach, w których od badacza wymaga się uzyskania wielu wyników (w tym powtórzeń eksperymentów) w krótkim czasie, przy zachowaniu dużej elastyczności w dysponowaniu swoim czasem w laboratorium i poza nim – praca z wykorzystaniem oksygrafu może nieco zniechęcać*”. Proszę o komentarz:

- ✓ Czy wykonywała Pani pomiary przy użyciu opisanych przyrządów (oksygraf-2k i Seahorse XFp Analyzer)?
- ✓ Czy możemy mówić o wiarygodnym wyniku jeśli nie wykonamy powtórzenia eksperymentu? Co znaczy „krótki czas”? Co znaczy wiele wyników?

W podrozdziale 2.6.2. Doktorantka analizuje wady i zalety coraz bardziej powszechnego wykorzystania metod modelowania komputerowego w projektowaniu leków. W swoich badaniach również opiera się na wynikach uzyskanych technikami *in silico*. Proszę o informacje jakie programy czy też techniki posłużyły do wyboru związków do dalszych badań eksperymentalnych.

Po obszernym wprowadzeniu literaturowym, w rozdziale III, Pani Anna Kubicka podaje uzasadnienie podjęcia tematu rozprawy i formułuje hipotezę badawczą. Przedstawia główny cel pracy, którym jest „***ocena przeciwnowotworowej aktywności nowych inhibitorów heksokinazy II (HKII) wyselekcjonowanych technikami in silico oraz wybór najbardziej efektywnej pochodnej (spośród przebadanych) pod kątem wykorzystania jej jako inhibitora HKII***” oraz dołącza krótko sformułowane, szczegółowe cele odpowiadające tematycznie postawionej hipotezie badawczej. Stwierdzenie „*wybór najbardziej efektywnej pochodnej*” sugeruje, że mamy do czynienia z pewną grupą związków. Proszę o komentarz i wyjaśnienie – jakiego związku chemicznego jest to pochodna?

W kolejnym rozdziale, *Materiały*, Doktorantka wymienia materiały i odczynniki używane do hodowli komórkowych oraz do analiz. Podaje spis stosowanej aparatury. Omawia wykorzystane linie komórkowe oraz zamieszcza struktury chemiczne trzech związków wybranych do badań *in vitro*. Wśród wymienionych materiałów zabrakło informacji o doksorubicynie: czy lek został zakupiony komercyjnie, w jakiej postaci? Szkoda też, że nie zostały podane pełne nazwy



związków, które zostały wybrane *in silico* i były przedmiotem testów na aktywność HKII w roztworze. Proszę o wyjaśnienie skrótów związków zamieszczonych w tabeli nr 2 (KJU-11, KJU-015 itd.) – podanie nazw chemicznych lub struktur badanych substancji.

Wiemy, iż „wyselekcjonowane metodami *in silico* związki były syntetyzowane lub modyfikowane przez zespół z Politechniki Śląskiej”. Proszę o doprecyzowanie informacji, czy wszystkie wybrane do badań związki były zsintetyzowane, w tym również glimepiryd, indometacyna i benserazyd? Czy wyniki dotyczące syntezy i analiz fizykochemicznych związków przedstawionych w tabeli nr 2 są dostępne/opublikowane?

W piątym rozdziale monografii mgr Anna Kubicka przedstawia kolejne etapy pracy doktorskiej, a w szóstym opisuje poszczególne metody badawcze i procedury z nimi związane. Badania zostały prawidłowo zaplanowane, a opis zastosowanych procedur jest klarowny i wystarczający, aby dać możliwość powtórzenia eksperymentów przez innych badaczy.

Doktorantka podaje przebieg oznaczeń wykonywanych w określonych warunkach środowiskowych, w tym temperaturowych. Proszę o uzupełnienie, w jakiej temperaturze były prowadzone pomiary? Brakuje też w opisie metodyki informacji w czym rozpuszczano związki będące przedmiotem badań, przy czym muszę zaznaczyć, iż uzasadnienie użycia określonej kombinacji rozpuszczalników znajdziemy w dyskusji (str. 120). W podrozdziale 6.6.1 Autorka napisała, iż „Dodano również [1U/mL] dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową”, czy używając jednostki aktywności enzymu nie powinniśmy podać 1 U/mL, proszę o komentarz. W podrozdziale 6.9.5. opisano zasady metody oznaczania jonów wapnia, w przebiegu metody mamy podane iż „sondę Fluo-3 AM (4 μ M/100 μ L HBSS/dolek”, następnie usuwano roztwór sondy z płytki i „zastępowano go roztworem HHBS”. Czy nie powinno być HBSS? W wykazie materiałów i w spisie skrótów nie widnieje HHBS.

W zależności od rodzaju zadania zastosowano szereg właściwie dobranych technik i metod badawczych, w tym MTT, liza komórek (aktywność HKII, Western Blot, FRAP, aktywność kaspazy-3,-8,-9), analiza faz cyklu komórkowego (metoda cytometryczna), pomiary reaktywnych form tlenu i azotu, pomiary potencjału błony mitochondrialnej, oznaczenie zawartości glutationu,



oznaczenie poziomu jonów wapnia (fluorymetryczna metoda z fluo-3 AM). Właściwe zaplanowanie i mnogość wykonanych testów wskazuje na dobre opanowanie warsztatu doświadczalnego i gotowość Doktorantki do samodzielnego prowadzenia prac badawczych.

Kolejne dwa rozdziały (7 i 8) *Wyniki* i *Dyskusja* stanowią około 50% manuskryptu. W rozdziale siódmym Doktorantka w przejrzysty i logiczny sposób, w postaci 38 wykresów i 6 tabel, przedstawiła uzyskane rezultaty. Kolejność prezentowania wyników jest zgodna z opisem poszczególnych metod i odpowiada założonym celom. W pierwszym etapie, z użyciem odpowiednich narzędzi komputerowych, wyłoniono grupę związków o właściwościach hamujących aktywność HKII. Na podstawie wyników testu inhibicji HKII z 16 związków do dalszej analizy aktywności biologicznej wybrano 3 znane i stosowane klinicznie leki: glimepiryd, indometacynę oraz benserazyd. Oceniono ich zdolność inhibicji HKII w liniach komórkowych raka wątroby HepG2 i Huh-7. Następnie przeanalizowano właściwości cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych. Sprawdzone także interakcje między badanymi związkami a doksorubicyną oraz, w kolejnych etapach, potencjalny synergizm przeciwnowotworowy takiego układu. Analizowano zmiany potencjału błonowego mitochondriów oraz poziom reaktywnych form tlenu i azotu w obecności poszczególnych związków oraz układu z doksorubicyną. Przy użyciu metod fluorymetrycznych i spektrofotometrycznych określono całkowity potencjał antyoksydacyjny oraz oceniono zmiany poziomu glutationu. W ostatnim etapie badań sprawdzono wpływ wybranych związków oraz ich kombinacji z doksorubicyną na indukowanie śmierci komórek.

Dyskusja została przeprowadzona rzetelnie z zachowaniem chronologii wykonanych badań. Mgr Anna Kubicka nie tylko przeanalizowała uzyskane wyniki, ale co jest bardzo istotne, porównała je z doniesieniami innych autorów zajmujących się podobną tematyką cytując adekwatne i aktualne publikacje. Świadczy to o dobrym przygotowaniu teoretycznym oraz o solidnym podejściu Autorki do omawianych zagadnień. Umiejętność wnikliwej, wielowątkowej dyskusji otrzymanych rezultatów wskazuje na bardzo dobrą znajomość zagadnień z zakresu biologii molekularnej, biochemii i biofizyki. Doktorantka przedstawiła również perspektywę dalszych badań oraz ich znaczenie praktyczne.



W opisie wyników i/lub w dyskusji brakuje podanego wprost uzasadnienia, dlaczego spośród wielu znanych leków to doksorubicyna została wybrana do testów? Proszę o komentarz, jakie kryteria o tym zadecydowały?

Konieczne jest także sprawdzenie cytotoksyczności układu badany związek/doksorubicyna względem komórek prawidłowych, co również podkreśla Doktorantka. W monografii zamieszczony został specjalny rozdział *Analiza SWOT w kontekście zastosowania inhibitorów HKII w leczeniu nowotworów*. Jest to interesujący fragment pokazujący, iż Doktorantka ma odpowiedzialne i krytyczne podejście do uzyskanych wyników. Potrafi wskazać silne i słabe strony dotychczasowej pracy oraz zaproponować optymalne rozwiązania.

W rozdziale „Wnioski” Autorka ustosunkowała się do postawionej w pracy hipotezy badawczej i wypunktowała najważniejsze efekty działania badanych związków. Zgadzam się z Doktorantką, że uzyskane wyniki, w szczególności stwierdzenie synergistycznego efektu połączenia glimepirydu z doksorubicyną, stanowią solidną bazę informacji oraz są podstawą do dalszych badań nad nowym schematem terapeutycznym w chorobach nowotworowych.

Mgr Anna Kubicka w dysertacji zacytowała aż 268 odpowiednio wybranych, anglojęzycznych pozycji literatury, z uznanych czasopism naukowych opublikowanych, poza uzasadnionymi wyjątkami, po roku 2010. Właściwy dobór piśmiennictwa świadczy o dobrej znajomości tematu i umiejętności świadomej krytycznej selekcji/analizy dostępnych źródeł naukowych i danych literaturowych.

Na koniec podaję kilka mniej istotnych uwag oraz o charakterze edytorskim:

- ✓ Nie wszystkie używane w dysertacji skróty zostały ujęte w załączonym *wykazie stosowanych skrótów i symboli*, np.: DAF -FM, DEVD, PPP, TOS, VWR, TBTS itd.
- ✓ Nie została zachowana konsekwencja w stosowaniu rodzaju czcionki do wyrażen anglojęzycznych, w wykazie skrótów zapisywanych czcionką pochyłą, w tekście manuskryptu różnie.
- ✓ W rozdziale III Doktorantka podaje jako podpunkt *a. Hipoteza badawcza*. Nie wydaje się konieczne punktowanie podrozdziału, gdyż nie ma kontynuacji.



- ✓ W pracy pojawiły się drobne błędy techniczne i edytorskie: powtórzenia, np. cytowania literatury str. 64, (*Morris i in. 1994, Togayachi i in. 2010*)(*Morris i in. 1994, Togayachi i in. 2010*), niepotrzebne kropki lub przecinki, np. „*sposób. .*”, str. 26; nieliczne literówki, np.: „*rozwój badań na chorobami*” str.16; brak w zapisie indeksów dolnych lub górnych, np.: CO_2 , Ca^{2+} ; niepotrzebne odstępy lub ich brak, kropki wstawione w wartościach liczbowych zamiast przecinków np. 21.1% , $0.5IC_{50}$, itp.
- ✓ Niegramatycznie sformułowane zdania np.: „*cytrynian i acetylo-CoA są kluczowymi produktami pośrednimi w syntezie lipidów*” str. 26; „*... napływając do mitochondriów, uzupełnienia produktów pośrednich cyklu Krebsa*” str. 26; „*W zależności od dostępnych informacji strukturalne cząsteczek można wyróżnić...*”, str. 42; „*W prawdzie w badaniach przedklinicznych ..., ale ich ..*”, str. 117; „*bardziej fluoryzującej*” itp.

Podsumowanie

Praca doktorska Pani mgr Anny Kubickiej zawiera elementy nowości naukowej, jest opracowaniem naukowym stanowiącym oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i przedstawia oryginalny wkład Doktorantki w dyscyplinę nauki biologiczne. Uzyskane wyniki są wartościowe ze względu na aspekt poznawczy oraz mają znaczenie aplikacyjne w projektowaniu potencjalnych leków do zastosowania w terapii przeciwnowotworowej. Należy podkreślić, że kombinacja glimepirydu z doksorubicyną została zgłoszona do opatentowania (Europejskie zgłoszenie patentowe: Pérez-Sánchez H., Tomczyk M., Legierski H., Matczak K., Kubicka A., Łabieniec-Watała M. „*Synergistic combination for the treatment of cancer*”, 24 kwietnia 2023 r.). Doktorantka wykonała wiele eksperymentów z użyciem odpowiednio dobranych metod i narzędzi. Otrzymała interesujące wyniki adekwatne do postawionego celu, umożliwiające zweryfikowanie postawionej hipotezy. Doktorantka nie tylko zna i potrafi wykorzystać szerokie spektrum technik, ale posiada również umiejętność krytycznej analizy uzyskanych wyników i prowadzenia dyskusji. Co wskazuje na dobre przygotowanie teoretyczne z zakresu realizowanego tematu. Biorąc pod uwagę przedstawioną do oceny rozprawę doktorską, jak również doświadczenie naukowe Doktorantki (współautorka trzech publikacji o sumarycznej liczbie MEiN=420 oraz IF=18,02) mogę stwierdzić, że mgr Anna Kubicka jest przygotowana do samodzielnej pracy naukowej.



Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa mgr Anny Kubickiej spełnia kryteria Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce stawiane pracom doktorskim. W związku z tym, uprzejmie wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Hanna Pruchnik