



Dr hab. Joanna Boncela, prof. IBM PAN
Pracownia Sygnalizacji Komórkowej
Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi

Łódź, 23 lutego 2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Anny Marii Kubickiej

pt. „ Ocena przeciwnowotworowej aktywności nowych inhibitorów heksokinazy II”

Wzrost liczby diagnozowanych przypadków chorób nowotworowych oraz fakt, że choroby nowotworowe stały się dominującą przyczyną zgonów wśród ludzi młodych i w średnim wieku powoduje, że nowotwory stanowią obecnie nie tylko narastający problem zdrowotny, ale ekonomiczny i społeczny, zarówno w Polsce i na świecie. Mimo dużego postępu w badaniach nad nowotworami wiele aspektów tych chorób pozostaje nie do końca poznanych min. ze względu na duży stopień heterogenności na poziomie komórkowym, i dlatego badacze wciąż poszukują intensywnie czynników oraz wzorców molekularnych charakterystycznych dla danej zmiany nowotworowej. Taka strategia badawcza może posłużyć do opracowania nowych precyzyjnych metod diagnostycznych lub skutecznej terapii celowanej. Tematyka rozprawy Pani mgr Anny Marii Kubickiej niewątpliwie wpisuje się w ten obszar badawczy.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została zrealizowana pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Łabieniec-Watały w ramach Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych prowadzonej przez Uniwersytet Łódzki. Promotorem pomocniczym była dr Karolina Matczak. Godnym podkreślenia w tym miejscu jest fakt, że wstępne etapy badań zostały zrealizowane we współpracy z Politechniką Śląską (Gliwice) oraz Katolickim Uniwersytetem San Antonio (Murcja, Hiszpania). Najbardziej wymiernym efektem tej współpracy jest europejskie zgłoszenie patentowe. Doktorantka jest też współautorką 3 publikacji, 2 prac przeglądowych i 1 pracy oryginalnej, opublikowanych w czasopiśmie *International Journal of Molecular Science*. Publikacje te są ściśle powiązane z tematyką rozprawy.

Badania Pani mgr Anny Marii Kubickiej opisane w przedłożonej mi do recenzji rozprawie doktorskiej dotyczą opracowania nowej strategii terapeutycznej opartej na inhibitorach heksokinazy II (HKII). Ze względu na to, że zaproponowane badania były prowadzone w odniesieniu do raka wątroby, który jest często diagnozowanym i trudnym do wyleczenia rakiem, wybór modelu eksperymentalnego uważam za słuszny a zarazem interesujący do realizacji celów badawczych w ramach pracy doktorskiej. Dodatkowo przeprowadzenie eksperymentów w kontekście wpływu wybranych związków na indeks terapeutyczny stosowanych już cytostatyków znacznie poszerza zakres zaproponowanych badań.

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Marii Kubickiej została przygotowana w języku polskim, obejmuje łącznie 170 stron i stanowi formę monografii typową dla tego typu rozpraw. Została klasycznie podzielona na następujące rozdziały: *Wstęp*, *Materiały*, *Metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Wnioski*. Wyżej wymienione rozdziały zostały uzupełnione o alfabetyczny wykaz skrótów i symboli umieszczonych w pracy, chronologicznie przedstawione w pracy ryciny i tabele, streszczenia w języku polskim i w języku angielskim oraz bibliografię. Rozdział *Literatura* zawiera 268 pozycji literaturowych, które są prawidłowo cytowane przez Doktorantkę w poszczególnych częściach rozprawy. Doktorantka wyodrębniła także rozdziały *Uzasadnienie podjęcia tematu*, *Etapy pracy* oraz *Analizę SWOT*, co było bardzo dobrą decyzją edytorską, znacznie ułatwiającą czytanie i zrozumienie całej rozprawy.

Moje zastrzeżenia do układu pracy budzi fakt, że duża część cytowanych pozycji literaturowych to prace przeglądowe. Moim zdaniem jeśli Autorka rozprawy opisuje poszczególne mechanizmy czy procesy to powinna odnosić się do konkretnych źródłowych prac oryginalnych, a nie ich podsumowań i zestawień, jakie stanowią prace przeglądowe. W pewnym sensie sama rozprawa doktorska jest opracowaniem przeglądowym prezentującym aktualny stan wiedzy w danej tematyce i winna cytować autorów/odkrywców poszczególnych mechanizmów i zjawisk. Pomimo powyższych uwag krytycznych stwierdzam, że pod względem edytorskim, praca została przygotowana w sposób bardzo staranny i przejrzysty, za co należą się słowa uznania dla Autorki oraz Pani Promotor i Promotor pomocniczej.

W części *Wstęp* Pani mgr Kubicka w sposób jasny i przystępny wprowadza czytelnika w przedmiot swoich badań. Autorka opisała następujące aspekty swojej rozprawy: cechy metabolizmu komórek prawidłowych i nowotworowych, rolę heksokinazy II w metabolizmie komórek, potencjalne wykorzystanie tego enzymu jako celu dla terapii przeciwnowotworowej, metody badawcze do oceny metabolizmu oraz wady i zalety wirtualnych metod przesiewowych. Dodatkowo wybrane, najistotniejsze części rozdziału zostały zilustrowane na 5 rycinach, co świadczy o doskonałym zrozumieniu prezentowanych zagadnień przez Autorkę. Moje uwagi krytyczne do tej części pracy odnoszą się przede wszystkim do rozdziału *Metody leczenia nowotworu wątrobowokomórkowego*, w którym Autorka wymienia tylko sorafenib jako skuteczny chemioterapeutyk w leczeniu tego nowotworu. Taki opis merytorycznie jest poprawny, ale nieadekwatny do rozdziału *Wyniki*, bo prowokuje natychmiast pytanie dlaczego zatem do badań nie został wykorzystany sorafenib tylko doksorubicyna, brak jest również informacji o zastosowaniu doksorubicyny w terapii raka wątroby. W rozdziale tym brakuje mi również opisu najnowszych schematów leczenia raka wątroby, np. wykorzystania immunoterapii. Poza tym w całej części teoretycznej Autorka mało konkretnie umotywowała zasadność podjęcia badań nad heksokinazą II w kontekście terapii przeciwnowotworowej, opis

obserwacji innych badaczy często jest zbyt ogólny, nie wiadomo czy dotyczą one konkretnych nowotworów czy wszystkich nowotworów. I tak na przykład str. 31 Autorka napisała: „... W dodatku autofagia indukowana przez HKII może wywołać oporność na chemioterapię w pewnych modelach nowotworów...” Dalej nie ma informacji jakie to konkretnie typy zmian nowotworowych, co powoduje pewien niedosyt u czytającego i nasuwa wątpliwości czy Autorka zna dogłębnie opisywany temat. Moje pozostałe krytyczne uwagi do tej części odnoszą się przede wszystkim do nieścisłości w opisach, używania żargonu laboratoryjnego lub zwrotów anglojęzycznych. I tak:

Str.15, użyto stwierdzenia *komórki patologiczne*, moim zdaniem w organizmach są tylko komórki prawidłowe i nieprawidłowe.

Str. 16, w zdaniu, że fenotypy metaboliczne komórek nowotworowych zależą od tkanki pochodzenia, nie wiem co Autorka ma na myśli, jaki rodzaj nowotworu, jeśli dalej opis dotyczy zmian w postaci guzów to sugeruje jeden rodzaj tkanki, tkankę nabłonkową.

Str.21, można było doprecyzować w jaki sposób kwaśne środowisko wpływa na wzrost i inwazyjność komórek nowotworowych. Zdanie w formie jak jest w rozprawie jest bardzo ogólne i nie dowodzi znajomości tematu.

Str.21, użyto stwierdzenia „tkanka nowotworowa” nie ma takiej tkanki, może być tkanka zmieniona nowotworowo.

Str.22, Autorka napisała zdanie: *Do najważniejszych czynników sprzyjających wystąpieniu efektu Warburga w komórkach nowotworowych należy zaliczyć: szlak kinazy PI3K, czynniki transkrypcyjne Myc i HIF-1 oraz enzymy glikolityczne.* Zdanie w takiej formie jest bardzo ogólne i nie dowodzi znajomości tematu, nie wiadomo jak w/w czynniki wpływają na efekt Warburga, czy zależą wzajemnie od siebie, działają razem osobno?

Str.23, użyto stwierdzenia, że komórki nowotworowe nie są zdolne do życia bez acetylo-CoA, który jest półproduktem do syntezy lipidów, to skłania do pytania czy komórki prawidłowe nie potrzebują acetylo-CoA?

Str.25, użyto stwierdzenia *kolonizacja przerzutów*, czy chodzi tu raczej o kolonizację innych tkanek przez komórki nowotworowe w celu utworzenia przerzutów. Poza tym czy powstawanie przerzutów to proces onkogenny? Co Autorka miała na myśli.

Hipoteza badawcza oraz cel główny i cele szczegółowe zostały jednoznacznie określone i dodatkowo poprzedzone rozdziałem *Uzasadnieniem podjęcia tematu pracy*. Mgr Kubicka w swojej rozprawie zaplanowała ocenę aktywności przeciwnowotworowej nowych, wyselekcjonowanych *in silico*, inhibitorów heksokinazy II, w tym określenie ich wpływu na indeks terapeutyczny doksorubicyny. Zaplanowane cele zostały przez Doktorantkę osiągnięte w toku prowadzonych badań.

Część doświadczalna pracy zaczyna się od obszernego opisu materiałów użytych w pracy. Opis jest szczegółowy i adekwatny do części *Wyniki*. Moje zastrzeżenia budzi rozdział 4.5, zawierający opis linii komórkowych raka wątrobowokomórkowego, HepG2 i Huh-7. Nie wiem co Autorka miała na myśli, pisząc, że są to linie stabilizowane *in vitro*, czy chodzi tu o to, że są to linie nieśmiertelnione, jeśli tak to użycie określenia stabilizowane jest mało precyzyjne i niefortunne. Poza tym przy opisie zastosowania linii jako modeli do konkretnych typów badań (str.50) warto by umieścić odpowiednie odnośniki literaturowe. Przy opisie linii śródłonka mikronaczyń HMEC-1 (str.51) Autorka napisała, że ich wzrost jest trzy do siedmiu razy

szybszy w porównaniu z innymi komórkami śródbłonka mikronaczyń, taki opis jest również dla mnie nieprecyzyjny, o jaki wzrost tu chodzi, czy Autorka miała na myśli czas podwojenia populacji? W porównaniu do jakich innych komórek śródbłonka, czy chodzi tu o linie czy komórki pierwotne?

Część pracy opisująca metody została poprzedzona rozdziałem opisującym etapy pracy, a dodatkowo rozdział ten zakończony jest schematem ilustrującym etapy pracy doktorskiej. Takie ujęcie toku badań było bardzo dobrym pomysłem, bo jest doskonałym wprowadzeniem do części eksperymentalnej rozprawy. Opis metod został przygotowany w sposób szczegółowy, umożliwiając odtworzenie eksperymentów. Do realizacji założonych celów badawczych i oznaczenia aktywności inhibitorów dla heksokinazy II w roztworze oraz lizatach komórkowych mgr Kubicka zastosowała całe spektrum metod badawczych i oszacowała min. ich cytotoksyczność, zdolność do generowania reaktywnych form tlenu i azotu, wpływ na całkowity potencjał antyoksydacyjny, zawartość glutationu, zmiany potencjału błonowego mitochondriów, intensywności procesu autofagii i apoptozy, poziomu jonów wapnia oraz faz cyklu komórkowego. Zakres metod zastosowanych w pracy jest imponujący - należy pogratulować Pani mgr Kubickiej doskonałego opanowania metodologii. Dzięki temu otrzymane wyniki tworzą kompletną charakterystykę badanych związków. Jeśli chodzi o tę część pracy to chciałbym poprosić o uściślenie informacji do pkt.6.2, a mianowicie jaka była wymagana żywotność komórek używanych do eksperymentów (w procentach), do pkt.6.6.1. czy do oznaczania aktywności dodawano 10 μ l lizatu komórkowego, nie biorąc w ogóle pod uwagę stężenia białka w tym lizacie, a jeśli tak czy stężenie białka w lizacie było zawsze takie samo pomiędzy eksperymentami czy tylko objętość? Jak było normalizowane stężenie białka pomiędzy eksperymentami? Proszę o również o doprecyzowanie czy enzym HKII był izolowany z linii komórkowych HepG2 i Huh-7, tak jak to napisano na str.52 w rozdziale *Etapy pracy* czy nie, czy raczej jego aktywność była oznaczana w lizacie komórkowym, bez izolowania białka. Proszę również o wyjaśnienie czy rzeczywiście tylko w eksperymentach mających na celu określanie rodzaju śmierci komórkowej, rozdział 6.9.1-3, komórki były wysiewane na jałowe naczynia hodowlane, a w pozostałych oznaczeniach nie stosowano sterylnych warunków hodowli, np. przed analizą cyklu komórkowego, rozdział 6.9.4, lub oznaczeniem poziomu jonów wapnia, rozdział 6.9.5 i wcześniejsze rozdziały 6.4-6.8.

Najbardziej interesująca część rozprawy to rozdział *Wyniki*, obejmująca 50 opisu uzupełnionego o 38 rycin i 5 tabel. Ilość stron opisu, rycin i tabel wskazuje, że Pani mgr Kubicka wykonała imponującą liczbę eksperymentów, które zostały starannie udokumentowane. W rozdziale tym Autorka wykazała, że badane związki wpływają na aktywność heksokinazy II oraz odpowiedź cytotoksyczną dwóch linii raka wątrobowokomórkowego, HepG2 i Huh-7. Osiągnięcie założonych celów badawczych było możliwe dzięki temu, że eksperymenty zostały przeprowadzone w sposób przemyślany, stanowią logiczną całość, nie brakuje odpowiednich kontroli. Do najbardziej wartościowych i oryginalnych wyników uzyskanych podczas realizacji rozprawy doktorskiej i przedstawionych w części eksperymentalnej, zaliczyłabym:

1. Wyselekcjonowanie trzech związków, tj. glimepirydu, indometacyny oraz benserazydu jako potencjalnych inhibitorów heksokinazy II.

2. Potwierdzenie, że powyższe związki hamują aktywność heksokinazy II w roztworze i w lizatach komórek linii pochodzących z raka wątroby
3. Potwierdzenie, że badane związki wykazują działanie cytotoksyczne wobec komórek linii pochodzących z raka wątroby.
4. Pokazanie, że glimepiryd w kombinacji z doksorubicyną wykazuje efekt synergistyczny w cytotoksycznym działaniu wobec komórek linii pochodzących z raka wątroby. Ta ostatnia obserwacja jest szczególnie interesująca ze względu na nowe, dotąd nie opisane zastosowanie tego związku w modulacji cytotoksyczności.

Na podstawie powyższego podsumowania wyników stwierdzam, że Pani mgr Kubicka w sposób oryginalny i nowatorski przeanalizowała i opisała aktywność przeciwnowotworową glimepirydu, indometacyny oraz benserazydu.

Moje krytyczne uwagi do tej części odnoszą się przede wszystkim do nadmiernie rozbudowanego sposobu prezentacji wyników od ryciny 12 do 38. Uważam, że Autorka niepotrzebnie przedstawiła wyniki jednego eksperymentu na trzech wykresach, osobno dla każdej kombinacji badanych związków, co utrudnia całościową analizę wyników. Taki sposób prezentacji wyników powoduje też wątpliwości czy przedstawione wyniki, np. oznaczenia poziomu reaktywnych form tlenu w danej linii komórkowej, rycina 7.12,13 i 14, dla badanych samych związków i w kombinacji z doksorubicyną były wykonywane w jednym eksperymencie (jedna mikropłytką) z jedną kontrolą, czy w trzech różnych eksperymentach każdy ze swoją kontrolą? Moim zdaniem przedstawienie wszystkich kombinacji związków na jednym wykresie dla danej linii komórkowej dałoby bardziej jednoznaczny i syntetyczny obraz wyników, ułatwiło ich interpretację oraz znacznie zmniejszyło liczbę rycin.

Biorąc pod uwagę obowiązki recenzenta związane z krytycznym spojrzeniem na ocenianą rozprawę doktorską, a w szczególności na otrzymane wyniki, chciałabym poddać pod rozwagę Autorki jeszcze inne moje uwagi i spostrzeżenia:

Proszę o wyjaśnienie dlaczego, nie podjęto w rozprawie próby przebadania związków wymienionych w Tabeli 2, które wykazywały podobną efektywność inhibitorową wobec heksokinazy II, np. związek KJU-011 i indometacyna. Nie znalazłam tej informacji w innych częściach rozprawy.

Str.68, dlaczego do określenia działania glimepirydu, indometacyny i benserazydu na wybrane linie komórkowe wybrano stężenia 10,50 i 100 μM , na jakiej podstawie?

Str. 69, błąd w tekście, opis działania benserazydu przedstawiony jest na ryc.7.4, a nie jak napisano na ryc.7.2.

Str.71, dlaczego do zbadania cytotoksyczności glimepirydu, indometacyny i benserazydu wybrano zakres stężeń 100-500 μM , na jakiej podstawie ?

Str.71, w zdaniu w rozdziale 7.2.1 napisano: „*Potencjalne inhibitory heksokinazy II wykazywały zróżnicowaną odpowiedź wobec dwóch linii komórkowych raka wątroby*” Dla mnie taki opis nie jest jasny. Czy inhibitory wykazują odpowiedź czy raczej komórki odpowiadają na zastosowane związki?

Str.73, z wykresu na rycinie 7.7 wynika, że komórki linii Huh-7 nie wykazują takiej wrażliwości na benserazyd, jak komórki HepG2, w zakresie zastosowanych stężeń, czym to może być spowodowane, czy ma to związek z charakterystyką badanych linii? Czy nie należało przeprowadzić doświadczeń z linią Huh-7 z zastosowaniem wyższych stężeń benserazydu?

Str.75, opis ryc.7.9. nie jest prawidłowy „Wpływ doxorubicyny na krzywe przeżywalności glimeperydu, indometacyny lub benserazydu w komórkach Huh-7” Na rycinie przedstawione są wyniki pomiarów przeżywalności komórek w obecności w/w związków a nie przeżywalność w/w związków w komórkach.

Str.88, treść podpisu pod ryciną 7.17 dotycząca stężenia doksorubicyny nie zgadza się z opisami słupków na rycinie.

Str.104, we wstępie do rozdziału 7.5.2. Autorka napisała „ Stężenie wapnia zmienia się w różnych obszarach komórkowych, a w cytoplazmie pozostaje na stosunkowo niskim poziomie, co zapewnia skuteczną sygnalizację wewnątrzkomórkową. ” Poproszę o komentarz do tego zdania. Czy zdaniem Autorki, tak jak to wynika z treści w/w zdania, niski poziom jonów wapnia w cytoplazmie, a nie zmiany/wzrost jego poziomu jest kluczowy w generowaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych ? A zatem jaki był cel oceny zmian poziomu jonów wapnia i o czym świadczy wzrost poziomu jonów wapnia w cytoplazmie po zastosowaniu badanych związków ?

Rozprawa doktorska zakończona jest rozdziałem *Dyskusja*, w której Autorka omawia swoje wyniki odnosząc je do aktualnego stanu wiedzy na temat metabolizmu komórek nowotworowych oraz wykorzystania jego składowych jako potencjalnych celów terapeutycznych. Tę część rozprawy oceniam najbardziej krytycznie. Moim zdaniem rozdział ten jest zbyt obszerny, zawiera wiele wątków luźno ze sobą połączonych, co wyraża się dużą ilością akapitów na stronie. Bardziej syntetyczne omówienie i podsumowanie wyników znajduje się według mnie w rozdziale 9 pt . *Analiza SWOT*. W dyskusji zabrakło mi również odniesień do zastosowania w badaniach komórek mikronaczyń śródbłónka jako modelu komórek prawidłowych. W innych częściach pracy nie znalazłam też odpowiedzi na pytanie dlaczego wybrano linię komórek śródbłónka mikronaczyń jako model komórek prawidłowych w tym układzie eksperymentalnym, czy wyboru dokonano w kontekście proponowanego schematu terapeutycznym, czy bardziej w kontekście raka wątroby ? W rozdziale *Dyskusja* znalazłam też inne fragmenty, które budzą moje wątpliwości, i co do których mam nadzieję, Autorka też odniesie się podczas publicznej obrony.

Na str.121 Autorka napisała, że badania prowadzono na enzymie wyizolowanym z komórek i enzymie komercyjnym. Czy w trakcie badań Doktorantka izolowała enzym z komórek, nie znalazłam takiej informacji w części *Metody* lub *Wyniki*? Co to jest enzym komercyjny?

Str.122, Autorka napisała, że benserazyd może mieć powinowactwo do innych białek, czy znane są te białka? Jeśli tak, dlaczego nie zostały wymienione.

Str.124, Autorka stwierdza, że wyniki badań wykazały, że interakcja pomiędzy doksorubicyną a badanymi inhibitorami nie jest prostym zsumowaniem stresu oksydacyjnego generowanego przez oba związki. Co wskazuje, jaki wynik eksperymentalny w pracy lub w literaturze, że doksorubicyna wchodzi w bezpośrednią interakcję z badanymi inhibitorami?

Na str.129 Autorka w dość zaskakujący dla mnie sposób podsumowuje wyniki w kontekście klinicznym odnosząc je do badań Schicht i współ. z 2022 roku, które ukazały się w czasopiśmie *Cancers*. Autorka na podstawie tej pracy stwierdza, że poziom HKII jest niski w komórkach izolowanych od chorych w porównaniu do komórek linii HepG2 i Huh-7. Moim zdaniem najważniejszą obserwacją w tej pracy odnoszącą się bezpośrednio do tematu rozprawy jest to, że komórki hepatoma lub hepatocyty izolowane od pacjentów wykazują niski poziom białka

HK II w przeciwieństwie do linii komórkowych HepG2 i Huh-7. Obserwacja to nasuwa fundamentalne pytanie czy wobec tego in vivo białko heksokinaza II jest potencjalnie dobrym celem terapeutycznym? Co więcej głównym wnioskiem postulowanym przez autorów cytowanej publikacji jest to, że powyższe linie komórkowe na skutek selekcji klonalnej i/lub hodowli in vitro nie odzwierciedlają heterogenności komórek guza i ich zróżnicowania metabolicznego, które ma miejsce in vivo i dlatego z wielką ostrożnością, i w ostateczności, należy wykorzystywać je jako model badawczy. W tym miejscu oczekiwałabym odniesienia się Autorki do głównych wniosków przedstawionych w rozprawie i wyjaśnienia następujących kwestii: jak powyższe obserwacje mają się do jej badań, których nadrzędnym celem jest opracowanie schematu terapii opartej na inhibitorach HKII i ich kombinacji z doksorubicyną do leczenia raka wątroby z użyciem właśnie linii HepG2 i Huh-7 jako modelu badawczego, dlaczego uważa ten model za optymalny wybór a otrzymane wyniki za wiarygodne w kontekście in vivo. W związku z tym, że nie znalazłam w *Dyskusji* odpowiedzi na w/w moje wątpliwości proszę o komentarz w trakcie publicznej obrony.

Przedstawione przeze mnie powyższe uwagi nie umniejszają jednak w żaden sposób wartości przedstawionej mi rozprawy. Mam nadzieję, że Pani mgr Kubicka przyjmie je jako cenne wskazówki, przydatne w jej dalszej karierze naukowej.

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z treścią rozprawy stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani Anny Marii Kubickiej spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami). Przedmiotem rozprawy jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W poszczególnych rozdziałach rozprawy Pani magister Anna Maria Kubicka wykazała się wiedzą teoretyczną w zakresie prowadzonych badań oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. A zatem zwracam się do Wysokiej Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pani mgr Anny Marii Kubickiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.