CENTRUM
BADAŃ
MOLEKULARNYCH
I MAKROMOLEKULARNYCH

POLSKIEJ
AKADEMII
NAUK
ŁÓDŹ

90-363 Łódź, ul. Sienkiewicza 112
Centrala: (0-42) 680-32-00
Dyrektor: (0-42) 680-32-18
Z-ca Dyrektora ds. Naukowych: (0-42) 680-32-14
Sekretariat Naukowy: (0-42) 680-32-32
e-mail: sncbmm@cbmm.lodz.pl

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Prof. dr hab. Barbara Nawrot
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
Dział Chemii Bioorganicznej
Ul. H. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź
Tel. +48-604 783945, +48 42 6308 248
Email: barbara.nawrot@cbmm.lodz.pl
www.cbmm.lodz.pl

12 marca 2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Marii Kubickiej pt.: „Ocena przeciwnowotworowej aktywności nowych inhibitorów heksokinazy II"

Niniejszą recenzję sporządziłam w związku z powołaniem mnie w dniu 19 grudnia 2023 roku przez Komisję Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne, reprezentowaną przez prof. dr hab. Agnieszkę Marczak - Przewodniczącą Komisji, na recenzenta w postępowaniu doktorskim mgr Anny Kubickiej. Zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668), w przedstawionej rozprawie doktorskiej oceniłam oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz ogólną teoretyczną wiedzę Doktorantki w dyscyplinie nauk biologicznych, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej pod opieką promotora.

Ocena formalna

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Magdaleny Łabieniec-Watały prof. UŁ w Katedrze Biofizyki Medycznej Instytutu Biofizyki, na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, w ramach Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UŁ. Funkcję promotora pomocniczego pełniła dr Karolina Matczak. Badania naukowe włączone do rozprawy doktorskiej zostały wykonane we współpracy z mgr. inż. Mateuszem Tomczykiem z Katedry Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii, Wydziału Chemii Politechniki Śląskiej, oraz z dr. Horacio Pérez-Sánchez z Katolickiego Uniwersytetu San Antonio w Murcji, w Hiszpanii.

Rozprawa doktorska jest objętościowo dosyć obszerna; opisana na łącznie 170 stronach tekstu, zawiera 47 rycin i 6 tabel, wykaz stosowanych skrótów i symboli, Wstęp literaturowy, rzadko spotykane Uzasadnienie podjęcia tematu pracy, a następnie Część doświadczalną, Etapy i Metody.

Kolejnymi dużymi rozdziałami są 59-stronicowe omówienie wyników i 15-stronicowa Dyskusja, podsumowanie wyników analizą SWOT, Wnioskami, streszczeniem w języku polskim i angielskim i liczącą aż 268 odnośników częścią literaturową. Jedną z cytowanych prac jest publikacja z pierwszym współautorstwem mgr Anny Kubickiej, opublikowana w roku 2022 w czasopiśmie z listy JCR *International Journal of Molecular Sciences*, która powstała w trakcie realizacji ocenianej rozprawy i dotyczy charakterystyki inhibitorów heksokinazy 2. Wyniki uzyskane w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej stały się także podstawą europejskiego zgłoszenia patentowego z dnia 24 kwietnia 2023 r. Zarówno struktura rozprawy jak i zawartość merytoryczna poszczególnych jej części nie budzą zastrzeżeń, a dobrze przygotowany Spis treści ułatwia lekturę pracy. **Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania rozprawy monograficznej stanowiącej dzieło naukowe. Zawiera wszystkie niezbędne elementy dzieła, takie jak podstawowe informacje naukowe, dane eksperymentalne i omówienie oryginalnych wyników własnych.**

Ocena merytoryczna

Celem ocenianej rozprawy doktorskiej była ocena aktywności przeciwnowotworowej nowych inhibitorów enzymu o nazwie heksokinaza, a dokładniej jej izoformy II (HKII). Nadekspresja tego enzymu jest obserwowana w komórkach niektórych nowotworów. Heksokinaza II spełnia ważną rolę w metabolizmie nowotworów i stała się celem terapeutycznym, zwłaszcza w poszukiwaniu efektywnych terapii w leczeniu raka wątroby. W części teoretycznej rozprawy, nazwanej w rozprawie Wstępem, Doktorantka szczegółowo przedstawiła obecny stan wiedzy na temat metabolizmu nowotworów. W interesujący sposób odniosła się do zagadnień związanych z bioenergetyką komórek rakowych, przy czym szczegółowo omówiła szlaki metaboliczne charakterystyczne dla komórek guzów nowotworowych i dla komórek prawidłowych. Podkreśliła znaczenie efektu Warburga, a więc glikolizy tlenowej, w zaspokojeniu bioenergetycznych i biosyntetycznych wymagań szybko proliferujących komórek nowotworowych. W oparciu o najnowsze doniesienia literaturowe przedyskutowała zagadnienia związane z przeprogramowanym metabolizmem komórek nowotworowych w odróżnieniu od komórek prawidłowych, głównie związanym ze zmienionymi szlakami metabolizmu glukozy i glutaminy, zwiększoną ekspresją enzymów metabolicznych zaangażowanych w lipogenezę, a także w dostarczanie półproduktów metabolicznych do syntezy aminokwasów i nukleotydów. Zauważyła, że komórki nowotworowe wykazują pewną plastyczność i zdolność adaptacji do określonych czynników środowiskowych, co według najnowszych badań możliwe jest dzięki nietypowym w pewnych specyficznych warunkach, ukrytym funkcjom enzymów metabolicznych, tzw. funkcjom *moonlighting*. Szczegółowo omówiła rolę heksokinazy II w metabolizmie nowotworów podkreślając, że jest to enzym specyficzny dla nowotworów o wysokiej aktywności glikolitycznej, katalizujący reakcję fosforylacji glukozy do jej fosforanu w pozycji 6. Podkreśliła, że HKII chroni komórki przed apoptozą indukowaną stresem oksydacyjnym lub zmianą przepuszczalności błony mitochondrialnej, a także pełni funkcję ochronną w autofagii komórek w odpowiedzi na niedobór glukozy.

W drugiej części Wstępu Doktorantka omówiła przyczyny występowania raka wątroby HCC i metody terapii tego schorzenia, a także podkreśliła niską skuteczność prowadzonych terapii wynikającą z heterogenności nowotworu. To ostatnie zjawisko związane jest ze zmienionym metabolizmem komórkowym i często z rozwojem oporności na stosowane terapie. Wysokie poziomy ekspresji heksokinazy II w zmianach o charakterze przedrakowym uznawane są za biomarker predykcyjny dla

rozwoju HCC, a w rozwiniętych nowotworach wskazują na złe rokowania, progresję choroby, przerzuty i ewentualnie oporność na leczenie. Tak więc, wybór heksokinazy II jako celu terapeutycznego jest w pełni uzasadniony. Doktorantka podsumowała, że dotychczas stosowane podejścia terapeutyczne polegające na zastosowaniu metforminy, 2-deoksy-D-glukozy czy 3-bromopirogronianu oraz innych, bioinformatycznie wyselekcjonowanych inhibitorów HKII, takich jak benserazyd czy benitrobenrazyd, nie doprowadziły do uzyskania skutecznych leków przeciw HCC. Finalnie Doktorantka omówiła metody wykorzystywane w badaniach metabolizmu komórkowego, wskazała ich zalety, wady oraz ograniczenia i obecne możliwości. W tej części nieco kolokwialnie potraktowała niektóre argumenty odnośnie stosowanych metod, pisząc np. że „automatyzacja pomiaru zwalnia badacza z obowiązku ciągłego monitorowania", bo zaoszczędzony czas „może przeznaczyć na inne działania" czy „praca z wykorzystaniem oksygrafu może nieco zniechęcić". Takie uwagi, jako mało istotne, niekoniecznie musiały znaleźć się w poważnej pracy naukowej.

Z racji pełnionej funkcji recenzenta chciałabym zwrócić uwagę Doktorantki na pewne nieprecyzyjne wyrażenia obecne w tej części rozprawy, które jednak w większości nie wymagają komentarza podczas obrony.

Str. 24: Zdanie „..wiele z powszechnie występujących w nowotworach mutacji onkogenów i genów supresorowych, które regulują metabolizm glukozy, jest również zaangażowanych w regulację metabolizmu glutaminy..." jest merytorycznie błędne, bo to nie mutacje są zaangażowane w regulację metabolizu, a geny z mutacjami.

Str. 25: W zdaniu „Zahamowanie lub ablacja tych enzymów prowadzi do zmniejszenia proliferacji i wzrostu guza." Jest to za duży skrót myślowy. Powinno być „Zahamowanie aktywności enzymów", a co do użycia słowa „ablacja" to proszę Doktorantkę o wyjaśnienie co autorka miała na myśli.

Str. 26: I ponownie bardzo żargonowe wyrażenie „komórki nowotworowe przekierowują węgiel z glikolizy do szlaku PPP" oraz enzymy wpływające na „przepływ węgla" (str. 37). Moim zdaniem lepiej byłoby użyć zwrotu „związki bogate w atomy węgla".

Str. 29: To nie stężenie glukozy hamuje aktywność enzymu, tak jak to napisano w zdaniu „aktywność HKIII jest hamowana przez fizjologiczne stężenia glukozy"

Str. 37: Zastosowano zbyt duży skrót myślowy w zdaniu „badania oparte na płytkach 96-, 24-, 12-dołkowych".

Str. 42: niepoprawnie użyto wyrażenie „skrystalizowana struktura białka". Jest też niespójność w słowie screening (selekcja, badania przesiewowe) – raz jest użyte „screeningu", a innym razem „screening'u"? Może lepiej byłoby użyć spolszczonej nazwy „skrining" z polską deklinacją?

Zagadnienia omówione we Wstępie dobrze wprowadzają czytelnika w aktualny stan wiedzy dotyczącej metabolizmu komórek nowotworowych i metod badania szlaków metabolicznych, szczególnie tych dotyczących raka wątrobowo-komórkowego (HCC). Jednocześnie świadczą o rozległej ogólnej wiedzy teoretycznej Doktorantki w uprawianej tematyce badawczej.

W kolejnej części rozprawy Doktorantka racjonalnie uzasadniła podjęcie badań nad heksokinazą II. Postawiła hipotezę badawczą, że nowe inhibitory poprzez zahamowanie aktywności fosforylującej HKII, będą efektywnymi związkami przeciwnowotorowymi i że zwiększą indeks terapeutyczny znanych cytostatyków. Precyzyjnie sformułowała cele cząstkowe czterech zaplanowanych działań, a mianowicie ocenę wpływu wybranych związków na aktywność HKII, analizę aktywności

przeciwnowotworowej badanych związków, wybór trzech najbardziej obiecujących potencjalnych inhibitorów HKII oraz zbadanie wpływu trzech wybranych inhibitorów na indeks terapeutyczny cytostatyków.

W rozdziale Materiały i Metody Doktorantka opisała detale podejścia eksperymentalnego w realizacji pracy doktorskiej. W rozdziale tym nie ustrzegła się pewnych nieścisłości w opisie poszczególnych doświadczeń. I tak np. w punkcie 6.6.1 (nie wiem, dlaczego 6.6.1 bo wystarczyłoby 6.6.) opisuje procedurę oznaczenia aktywności heksokinazy II w warunkach *„in solution"* i *„in vitro"*. Dobrze byłoby już tutaj wytłumaczyć, co to znaczy aktywność HKII w roztworze (a nie *in solution*), a co w warunkach *in vitro*. Co więcej, użyte tutaj rozróżnienie jest moim zdaniem nieprecyzyjne, bo niezależnie czy test jest robiony z użyciem czystego enzymu, lizatu komórkowego, czy też w samych komórkach, to zawsze jest to metoda poza organizmem, w szkle, a więc *in vitro*. W opisie Zasady metody pojawił się też błąd wynikający z niedopowiedzenia istotnego faktu, a mianowicie po zdaniu: „W teście wykorzystanym do oceny aktywności HKII w roztworze oraz w komórkach, wykorzystano zdolność tego enzymu do przekształcania glukozy w glukozo-6-fosforan." Doktorantka pisze, że „W procesie tym (*a więc jak w powyższym zdaniu – fosforylacji glukozy*) glukozo-6-fosforan ulega utlenieniu przez dehydrogenazę glukozo-6-fosforanu, co prowadzi do powstania NADPH....", co oczywiście jest skrótem myślowym. Poprawnie powinno być „W kolejnym procesie ...." . Ponadto, czy NADPH jest produktem ubocznym? Produkt uboczny to produkt powstający z tego samego substratu w innej reakcji i tworzy się z niższą wydajnością niż produkt główny. W przypadku transformacji $NADP^+$ do NADHP jest to główny (i jedyny) produkt tej reakcji redukcji.

W sekcji 6.6.1. brak poprawnego opisu zasady oznaczenia aktywności HKII, tj. wytłumaczenia skąd bierze się barwny produkt przemiany. Jaki proces zapewnia pojawienie się diagnostycznego pasma w UV? Czym różni się oznaczenie aktywności HKII w roztworze i w komórkach i dlaczego pomiar kolorymetryczny jest przy innym λ_{max} w obu tych przypadkach? W opisie brak jest informacji jak wykonuje się poszczególne oznaczenia; nie wiadomo, do których testów użyto czystego enzymu, lizatu komórkowego czy też komórek hodowanych na płytkach 96-dołkowych. Jeśli test był wykonany w komórkach nowotworowych to dlaczego do testu dodawano heksokinazę II oraz dehydrogenazę G6P? Pytania te wymagają wyjaśnienia podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że Część doświadczalna została opracowana starannie, z podaniem niezbędnych szczegółów eksperymentalnych, zarówno w zakresie materiałów jak i metodyki, z wyjątkiem kilku wspomnianych niedokładności, które wzbudziły moje wątpliwości. Dla każdego eksperymentu zastosowano identyczny schemat opisu podając najpierw Zasadę działania metody a następnie Przebieg oznaczenia.

Recenzowana rozprawa doktorska wykonana przez Panią mgr Annę Marię Kubicką obejmowała **badania biologiczne serii związków** - potencjalnych inhibitorów enzymu HKII, wyselekcjonowanych w bioinformatycznych badaniach przesiewowych przeprowadzonych przez zespół bioinformatyków z Katolickiego Uniwersytetu San Antonio w Murcji, a następnie syntetycznie wytworzonych przez mgr. Inż. Mateusza Tomczyka z Katedry Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii Wydziału Chemii Politechniki Śląskiej.

Badania biologiczne zostały opisane w rozdziale **Wyniki**, a otrzymane rezultaty omówione w rozdziale **Dyskusja**. Najbardziej istotnym jest fakt, że Doktorantka w teście aktywności rekombinowanej (czystej) heksokinazy II oznaczyła aktywność inhibitorową 16 różnych, wyselekcjonowanych wcześniej związków i z tej grupy wybrała trzy – benserazyd, glimepiryd i indometacynę – do dalszych badań.

Podstawą wyboru była wykazywana aktywność inhibitorowa w stosunku do enzymu KHII i fakt, że są to już stosowane leki. I tutaj mam pytanie, dlaczego nie podjęto badań związków wykazujących wyższą aktywność inhibitorową w stosunku do HKII, takich jak np. KJU-015 i KJU-011, które były trzykrotnie bardziej aktywne niż wybrany benserazyd? Związek ten był najsłabszym inhibitorem spośród trzech wyselekcjonowanych związków w teście komórkowym prowadzonym w komórkach Huh-7 i HepG2 i jego aktywność inhibitorowa była niezależna od stężenia. Warto zauważyć, że aktywność inhibitorowa wyselekcjonowanych związków Glim, Ben i Indo w stosunku do HKII była niższa niż aktywność wzorcowej kontroli pozytywnej, jaką był 3-bromopirogronian. W badaniach komórkowych wybrano dwie linie komórkowe ludzkiego raka wątrobowokomórkowego, a mianowicie linię Huh-7 i linię HepG2, a jako linię prawidłową stosowano linię komórek śródbłonka mikronaczyniowego HMEC-1, wszystkie pozyskane komercyjnie z ATCC (USA) i ECACC (UK). Obie testowane linie komórkowe raka wykazały podwyższony poziom ekspresji docelowego białka w porównaniu do poziomu HKII w linii prawidłowej. Testowane związki okazały się być słabo cytotoksyczne w teście aktywności mitochondrialnej komórek Huh-7 i HepG2 (nie chodzi tu o spadek proliferacji, jak to jest napisane na str. 71) i w stężeniach co najmniej 300 µM wykazywały niewielki efekt synergiczny w stosunku do aktywności doksorubicyny. Doktorantka wykazała, że doksorubicyna wywołuje efekt cytotoksyczny w stężeniach trzy rzędy wielkości niższych niż badane związki. Można zatem postawić pytanie, czy zasadne było dalsze badanie aktywności przeciwnowotworowej wyselekcjonowanych związków nakierowanych na inhibicję aktywności białka HKII? Doktorantka nie poddała się i stosując odpowiednie sondy fluorescencyjne przebadała wpływ trzech testowanych inhibitorów, także w mieszaninie z doksorubicyną, na poziom reaktywnych form tlenu i azotu w komórkach Huh-7 i HepG2 inkubowanych przez 72 godz. Wykazała, że badane inhibitory mają potencjał do indukowania produkcji RFT i RFA w obu testowanych liniach komórkowych, natomiast w mieszaninie z doksorubicyną w stężeniu IC_{50} i 0,5 IC_{50} wyniki były zróżnicowane, od synergicznego wzrostu poziomu RFT/RFA, po brak zmian w stosunku do tych obserwowanych dla pojedynczych związków. Zaobserwowała także, że zarówno pod wpływem trzech testowanych związków jak i w skojarzonym podaniu z doksorubicyną następuje podobny spadek potencjału błony mitochondrialnej, będący wynikiem depolaryzacji błony komórkowej. W kolejnym teście, tzw. teście FRAP, sprawdzany był całkowity potencjał antyoksydacyjny komórek poddanych działaniu testowanego związku. W tym teście Doktorantka określiła kolorymetrycznie zdolność lizatu komórkowego do redukcji sondy chemicznej zawierającej jon żelaza Fe(III) do jej barwnej pochodnej z jonem Fe(II) i stwierdziła, że zarówno pojedyncze inhibitory, jak i ich mieszaniny z doksorubicyną wywołują spadek właściwości przeciwutleniających, a więc obniżają właściwości redukujące komórki. Ponieważ wolne rodniki mogą być także zredukowane przez glutation, Doktorantka w takich samych lizatach oznaczyła poziom zredukowanego glutationu i zaobserwowała spadek jego poziomu, bardziej wyraźny w komórkach linii Huh-7 w porównaniu do komórek HepG2. Moim zdaniem, wyniki te są spójne z wykazanym wcześniej potencjałem testowanych związków do indukcji stresu oksydacyjnego, co oczywiście przekłada się na niższy potencjał redukcyjny komórki. Ciekawym badaniem wykonanym w ramach charakterystyki biologicznej trzech wytypowanych związków była ocena wpływu glimepirydu, indometacyny i benserazydu na rozkład faz cyklu komórkowego w komórkach Huh-7 i HepG2. Wyniki badań wykonanych przez Doktorantkę z wykorzystaniem cytometru przepływowego zostały szczegółowo stabelaryzowane w Tabelach 5 i 6 (szkoda, ze nie przedstawiono oryginalnych wykresów, przynajmniej przykładowych). Dla każdej z faz cyklu komórkowego podano wyznaczoną wartość procentową oraz poziom istotności statystycznej, w większości o wartości $p<0,001$ względem kontroli. Badania te wykazały, że badane związki wywołują wzrost odsetka komórek apoptotycznych

w fazie subG1, także w przypadku ko-inkubacji z doksorubicyną. W kolejnych etapach Doktorantka podjęła się zbadania w jakim procesie, na jakim szlaku następuje śmierć komórki. Wykorzystując testy ze specyficznymi substratami dla kaspaz 3, 8 i 9, wykazała, że śmierć komórek traktowanych badanymi związkami, także w skojarzeniu z doksorubicyną zachodzi poprzez aktywację inicjatorowej kaspazy 9 na szlaku mitochondrialnym i wykonawczej kaspazy 3. Temu procesowi towarzyszy wewnątrzkomórkowy wzrost poziomu jonów wapnia. Podjęła się także określenia intensywności procesu autofagii wykorzystując do tego celu fluorescencyjną pochodną dansylową sprzęgniętą z kadaweryną. Wyniki tych badań nie wniosły informacji co do istotnego wpływu badanych inhibitorów HKII na przetrwanie komórek, gdyż wykazano, że jedynie najmniej toksyczny benserazyd podnosi poziom autofagii w obu testowanych komórkach. Pozostałe wyniki badań nie osiągnęły statystycznej istotności.

Przeprowadzona przez Doktorantkę **dyskusja wyników** w pierwszym etapie dotyka problemu skłonności inhibitorów heksokinazy II do tworzenia agregatów w roztworach wodnych i buforach, co może przyczyniać się do uzyskiwania wyników fałszywie pozytywnych w badaniach przesiewowych. Nie rozumiem, jak to zjawisko może zachodzić w wymienionych tutaj testach wirtualnych. Doktorantka wzmiankuje, że zastosowanie DMSO i ewentualnie Tween-80 może być rozwiązaniem problemu rozpuszczalności agregatów, ale też może prowadzić do zafałszowania wyników, jako że DMSO może dawać addukty z niektórymi lekami (jak np. z cis-platyną). To ostrzeżenie nie przełożyło się jednak na konkretną informację, czy w pracy doktorskiej zostały wykonane badania rozpuszczalności testowanych inhibitorów HKII i jeśli tak, to finalnie jaki/który rozpuszczalnik był zastosowany do przygotowania roztworów glimepirydu, indometacyny i benserazydu. I do czego posłużył DMSO wymieniony jako reagent stosowany w badaniach (str. 10).

Doktorantka szczegółowo przedyskutowała właściwości testowanych inhibitorów HKII w kontekście najnowszych danych literaturowych. Wspomniała m.in. o kontrowersyjnym wpływie glimepirydu na komórki rakowe, gdyż lek ten z jednej strony zwiększa ryzyko zachorowania na raka np. u pacjentów z cukrzycą typu 2, a z drugiej strony ma pozytywny wpływ na zahamowanie wzrostu guza okrężnicy czy glejaka. Podkreśliła jednak, że w jej testach glimepiryd wykazywał cytotoksyczność (tutaj znów błędnie użyte „hamował proliferację") w obu badanych liniach komórkowych, a efekt był synergiczny w obecności doksorubicyny. Nie bardzo rozumiem skąd mowa o cytotoksyczności antracykliny w komórkach HepG2 poddanych działaniu indometacyny i benserazydu (str. 123). Mam też uwagę odnośnie użycia nazwy „białko księżycowe" (str. 124, 130), w stosunku do białka, które wykazuje inne, niestandardowe (ukryte) właściwości. W tym przypadku może lepiej zastosować nazwę angielską białko *moonlighting*? Chciałabym też zwrócić uwagę na tendencję Doktorantki do nadinterpretacji niektórych wyników, jak np. w przypadku badania indukcji procesu autofagii, gdzie po zdaniu „W niniejszych badaniach indukcja procesu autofagii była niewielka lub nie występowała (po zastosowaniu samych związków w komórkach Huh-7)", pisze, że „Widoczny wzrost procesu autofagii zaobserwowano po zastosowaniu kombinacji glimepirydu, indometacyny bądź benserazydu z doksorubicyną w stężeniu IC_{50}." Opinia ta opiera się na wyniku statystycznie nieistotnym, stąd nie jestem pewna, czy uprawnione jest stwierdzenie, że „Może to sugerować, że uszkodzenia wywołane przez badane związki są na tyle duże, że proces autofagii nie jest w stanie ich usunąć i tym samym uchronić komórki przed śmiercią."

Sumarycznie, otrzymane przez Doktorantkę wyniki pokazały, że wszystkie trzy badane związki hamują aktywność heksokinazy II, są cytotoksyczne w wyższych stężeniach w obu testowanych liniach komórkowych, wykazują potencjał prooksydacyjny i prowadzą do śmierci komórki na drodze

indukowanej na szlaku mitochondrialnym apoptozy. Wyniki te stanowią silną stronę według analizy SWOT, którą Doktorantka przeprowadziła w końcowym etapie rozprawy doktorskiej. Do słabych stron zaliczyła fakt, że badane inhibitory wykazują brak selektywności do białka docelowego. Wspomina także o tworzeniu agregatów, ale ten problem wymaga wyjaśnienia, bo Doktorantka nie opisała żadnych problemów i badań w tym zakresie. W mojej opinii otrzymane wyniki otwierają drogę do dalszych, bardziej zaawansowanych badań w kontekście potencjalnych leków przeciwnowotworowych, także działających synergicznie z już stosowanymi chemioterapeutykami.

Podsumowanie

Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą w tematyce rozprawy doktorskiej i zrealizowała założone cele badawcze uzyskując oryginalne wyniki dotyczące wpływu trzech inhibitorów heksokinazy II na procesy komórkowe zachodzące w dwóch liniach komórek raka wątroby. Praca jest eksperymentalnie obszerna, przeprowadzona rzetelnie i zgodnie z wysokimi standardami naukowymi. Wachlarz zdobytej wiedzy i umiejętności praktycznych spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Doktorantka wykazała się samodzielną pracą naukową, dokonała szeregu istotnych obserwacji i zidentyfikowała mechanizmy cytotoksycznego działania badanych związków w komórkach rakowych, które mogą być dalej badanie w kierunku rozwoju nowych leków przeciwnowotworowych. Zakres stosowanych metod odnosi się do typowych testów stosowanych w biologii medycznej, od badań inhibicji aktywności rekombinowanego enzymu do badań przeprowadzonych w systemie komórkowym, takich jak badanie właściwości cytotoksycznych, zdolności do produkcji reaktywnych form tlenu i azotu, określenia poziomu zdolności antyoksydacyjnych, integralności błony mitochondrialnej, mechanizmu indukcji apoptozy czy indukcji autofagii. Należy tutaj podkreślić, że poszczególne doświadczenia wykonane zostały w wymaganej ilości powtórzeń, a uzyskane wyniki były starannie zanalizowane pod względem istotności statystycznej i zilustrowane na odpowiednich wykresach i w tabelach. Doktorantka świetnie dała sobie radę z interpretacją i opisem otrzymanych wyników, aczkolwiek w niektórych fragmentach rozprawa mogłaby być nieco bardziej zwięzła. Rozprawa zawiera jedynie nieliczne błędy gramatyczne i cechuje się porządnie opracowaną szatą graficzną. Tak więc, uważam, że Pani Anna Maria Kubicka zrealizowała założone cele badawcze i stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Wniosek końcowy

Na podstawie wyżej omówionych osiągnięć stwierdzam, że przedstawiony do oceny materiał spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668). Wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne, o dopuszczenie Pani mgr Anny Marii Kubickiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.