

Kraków, 16 sierpnia 2023 roku

Dr hab. Małgorzata Pierzchalska
Uniwersytet Rolniczy
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Wydział Technologii Żywności

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR JOANNY STALIŃSKIEJ „SZLAKI METABOLIZMU ENERGETYCZNEGO JAKO POTENCJALNY CEL TERAPII GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO Z ZASTOSOWANIEM NOWYCH POCHODNYCH FENOFIBRATU”

Widoczny w ostatnich latach znaczący postęp w onkologii nie dotyczy jednak niestety wszystkich typów nowotworów. W szczególności złośliwy nowotwór mózgu – glejak wielopostaciowy (GBM) stanowi przykład choroby wciąż nieuleczalnej, w której przebiegu prognoza przeżycia pacjenta od diagnozy liczy się nie w latach a w miesiącach. Badania mające na celu wynalezienie skutecznej strategii leczenia glejaków wielopostaciowych prowadzone są w wielu ośrodkach na świecie. Są one nadzieją dla chorych i mają potencjalnie duże znaczenie społeczne, gdyż glejak jest najczęstszym i również najbardziej agresywnym nowotworem mózgu występującym u dorosłych.

Należy stwierdzić, że badania Pani mgr Joanny Stalińskiej stanowiące trzon przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej wpisują się w szerszy nurt poszukiwania leków onkologicznych, których mechanizm działania wiąże się z ingerencją w specyficzny metabolizm komórek tworzących guzy nowotworowe. Jednym z obecnie szeroko badanych związków mających wpływ na metabolizm energetyczny komórek nowotworowych jest fenofibrat (FF) – lek z grupy fibratów stosowanych powszechnie w terapii hipercholesterolemii. Idea stosowania FF w leczeniu nowotworów wiąże się z zahamowaniem przez ten związek fosforylacji oksydacyjnej, potencjalnym wywoływaniem tzw. „katastrofy metabolicznej” i następującej po niej apoptozy komórek nowotworowych. Jak wynika z treści rozprawy oraz literatury przedmiotu badania Autorki są częścią większego projektu naukowego

zakładającego, że niektóre nowe pochodne FF mogą być skuteczniejsze w leczeniu GBM dzięki wyższej cytotoxyczności, lepszej rozpuszczalności w wodzie i zwiększonej możliwości przekraczania bariery krew-mózg.

Przystępując do oceny przedłożonej pracy spróbuję odpowiedzieć na trzy pytania ważne dla przebiegu przewodu doktorskiego. Po pierwsze, czy na podstawie przedłożonej pracy można stwierdzić, iż autorka posiada wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki biologiczne uprawniającą do nadania stopnia doktora. Po drugie, czy przedstawiony w treści rozprawy przebieg pracy badawczej świadczy o dojrzałości naukowej i zdolności do samodzielnego planowania, prowadzenia i interpretacji wyników badań. Po trzecie, czy przedkładana praca opisuje oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego.

Rozprawa doktorska mgr Joanny Stalińskiej liczy sto siedemdziesiąt dwie strony maszynopisu, ma typowy dla pracy doświadczalnej układ rozdziałów. Pracę rozpoczyna spis skrótów i streszczenia w języku polskim i angielskim. Wstęp teoretyczny liczy szesnaście stron i zawiera jedną tabelę podającą klasyfikację glejaków wg. WHO oraz cztery ryciny przedstawiające schematycznie modele komórkowe wykorzystywane w badaniach nad glejakiem, oddychanie mitochondrialne, strukturę bariery krew-mózg oraz schemat modelu tej bariery *in vitro*. W stosunkowo krótkim wstępie Autorka skupia się na zagadnieniach bezpośrednio związanych z częścią eksperymentalną, sprawnie i logicznie wprowadzając czytelnika w tematykę związaną z fizjologią komórek glejaka wielopostaciowego (w tym komórek macierzystych tego nowotworu) i potencjalnym wykorzystaniem FF w onkologii, oraz modelami *in vitro*, które wykorzystuje się w badaniach nad GBM. Szczegółowo i wyczerpująco opisuje także barierę krew-mózg i jej modele, jako istotny element w badaniach nad lekami używanymi w terapii nowotworów mózgu.

We wstępie zacytowano 93 pozycje literatury, w większości ważne prace doświadczalne z ostatnich dziesięciu lat, oraz niektóre prace starsze, o dużym znaczeniu dla rozwoju wiedzy

na temat metabolizmu energetycznego komórki nowotworowej. Ich właściwy dobór wskazuje na dogłębną znajomość zagadnień dotyczącej biologii nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem GBM.

Wyjątkowo istotny w kontekście sformułowania celu pracy wydaje się rozdział 1.2 dotyczący metabolizmu komórek glejaka. Rozdział rozpoczyna opis „efektu Warburga”. Szkoda, że nie została tu zacytowana oryginalna praca tego badacza z lat dwudziestych XX w. o niewątpliwie przełomowym znaczeniu dla poznania fizjologii komórki nowotworowej. Współczesna literatura tego przedmiotu jest bardzo bogata, niekiedy sprzeczna, a jej przedstawienie w tak krótkim tekście nie było prostym zadaniem. Ten fragment wstępu mógłby być nieco rozbudowany, oraz lepiej napisany pod względem merytorycznym i stylistycznym, tak aby można było wyróżnić w nim wprowadzenie, rozwinięcie i koniec. Dodatkowo uzupełniająca rozdział Ryc. 2 (przedstawiająca schemat fosforylacji oksydacyjnej) nie jest nigdzie cytowana w tekście i nie nawiązuje bezpośrednio do treści rozdziału, który skupia się na znaczeniu glikolizy i fosforylacji oksydacyjnej dla progresji GBM. W końcowej części rozdziału 1.4 (pt. „Fenofibrat w terapii glejaka wielopostaciowego”) Autorka po raz pierwszy wspomina o projekcie badawczym w ramach którego zsyntezowano pochodne FF nazwane związkami PP (projekt był kierowany przez prof. Krzysztofa Reissa z Louisiana State University oraz prof. Branko Jursica z University of New Orleans). Szkoda, że fragment dotyczący tego projektu nie został bardziej rozbudowany, zarówno jeśli chodzi o jego podstawy teoretyczne jak i zagadnienia formalne. Pomogłoby to zrozumieć wzajemne relacje między badaniami własnymi Autorki; tymi wykonanymi w Polsce, tymi realizowanymi w ramach projektu w czasie stażu zagranicznego w Stanach Zjednoczonych, a całym projektem prowadzonym przez uczelnie amerykańskie. Jest to szczególnie istotne w kontekście informacji umieszczonej na początku rozprawy, że niektóre wyniki były już opublikowane w wieloautorskich pracach będących zapewne efektem realizacji wspomnianego projektu oraz

informacji, że badane związki chronione są zgłoszeniem patentowym. Autorka powinna bliżej opisać jak te relacje wyglądały w odpowiedzi na recenzje w czasie publicznej obrony.

W Rozdziale 2 zatytułowanym „Cel pracy” została prosto i jasno sformułowana hipoteza o większym od macierzystego związku potencjale antynowotworowym względem GBM niektórych nowych pochodnych FF oraz podano szczegółowo cztery sposoby weryfikacji tej hipotezy. Wydaje się, że czwarty ze „sposobów” weryfikacji hipotezy: „próba określenia potencjału zastosowania nowych pochodnych FF jako terapii GBM”, odnosi się raczej do rozważań teoretycznych i nie był przez Autorkę podjęty w formie wykonania doświadczeń, gdyż wymagałoby to zastosowania modeli zwierzęcych. Nie jest jednak możliwe zastosowanie terapii bez wystąpienia choroby.

W Rozdziale 3 zostały omówione użyte w doświadczeniach materiały, w tym 203 nowe pochodne PP. Szczegółowe dane o tych związkach znalazły się w tabeli na końcu pracy jako materiały uzupełniające. Tabela ta, oprócz wzorów strukturalnych i masy molowej zawiera też wynik testu żywotności MTT. W Rozdziale 4 Autorka dokładnie i wyczerpująco opisuje zastosowane metody badawcze oraz wykorzystaną aparaturę. Należy podkreślić obszerne wyjaśnienie funkcjonowania aparatu Seahorse XF i procedury wykonania testów metabolicznych z jego wykorzystaniem oraz dokładny opis znaczenia biologicznego i sposobu określania parametrów mierzonych w trakcie wykorzystania modelu komórkowego bariery krew-mózg (TEER, P_{app} , P_e). Wszystkie te informacje uzupełnione o dane zawarte w rozdziale „Wyniki” pozwoliłyby na ewentualne odtworzenie układu doświadczalnego i przeprowadzenie podobnych badań przez innych naukowców. Fragmenty te pozwalają sądzić, że Autorka posiada niezbędną wiedzę i doświadczenie w przeprowadzaniu doświadczeń z użyciem tych dwóch unikalnych metod, gdyż potrafiła je logicznie i jasno opisać.

W Rozdziale 5 Pani mgr Joanna Stalińska przedstawia wyniki swojej pracy badawczej dotyczącej wpływu niektórych pochodnych FF na komórki GBM *in vitro*. Rozdział ten zawiera

44 oryginalne ryciny przedstawiające wyniki uzyskane różnymi metodami w różnych modelach komórkowych. Układ rozdziału, podział na podrozdziały, dobór odpowiedniej formy wykresów jest logiczny i podporządkowany realizacji naukowego celu. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że w rozprawie opisano różne testowane strategie doświadczalne – przeprowadzenie badań w pożywkach o różnej zawartości glukozy, w obecności i bez pirogronianu w pożywce, użycie inhibitorów glikolizy, glutaminolizy, autofagii, hodowle 2D i 3D, porównanie wyników uzyskanych z wykorzystaniem różnych linii glejaka, w tym pochodzących od pacjentów (GBM12). Świadczy to o konsekwentnej próbie wyjaśnienia mechanizmów odpowiadających za obserwowaną *in vitro* cytotoksyczność badanych związków. W rozdziale „Dyskusja” Autorka wykazuje się zrozumieniem zastosowanych strategii doświadczalnych, ograniczeń stosowanych modeli komórkowych i stopnia skomplikowania mikrośrodowiska guza *in vivo* w stosunku do uproszczonego środowiska, w którym badane są komórki nowotworowe *in vitro*. Wszystko to prowadzi do wysnucia rozsądnego wniosku, że przewidywanie skuteczności klinicznej badanych PP na podstawie wyników opisanych w rozprawie jest bardzo złożonym procesem. W rozprawie znajdziemy nawet ostrożną sugestię, że zastosowanie kliniczne pochodnych FF może skutkować progresją nowotworu. Na podstawie lektury „Dyskusji wyników” można bez wątpliwości stwierdzić, że Autorka posiada umiejętność właściwej krytycznej oceny zaproponowanej przez siebie drogi do rozwiązania ważnego i oryginalnego problemu naukowego, jakim jest ustalenie potencjału antynowotworowego pochodnych FF. Wyrażając uznanie dla konsekwencji, pracowitości i dojrzałości intelektualnej Autorki rozprawy z recenzenckiego obowiązku przedstawię pewne krytyczne uwagi dotyczące uzyskanych przez Autorkę wyników i sposobu ich opisu:

1. Należy podkreślić, że przeważająca większość eksperymentów opisanych w rozprawie wykonana była z użyciem jednej pochodnej FF – PP1. Tak ambitny cel jak przetestowanie właściwości wielu pochodnych różnymi metodami byłby

zupełnie niemożliwy do realizacji w ramach przygotowania rozprawy doktorskiej, ale dla większej jasności wyводу byłoby dobrze odnieść się do faktu wykonania większości badań z użyciem jedynie „pierwszej” pochodnej FF, uwzględniając to na przykład w trakcie formułowania celów szczegółowych badań. W opisie wyników Autorka odwołuje się również do Tabeli 9 umieszczonej w części uzupełniającej na końcu pracy i wyników testów żywotności MTT przeprowadzonych dla ponad 200 związków z użyciem linii LN-229. Dodatkowo podana wartość IC50 dla pochodnej PP1 na Ryc. 12 wynosi 8,05, w tabeli zaś podano wartość 7,7 – ta niewielka różnica świadczy, że były to dwa niezależne eksperymenty. Nie jest więc jasne, dlaczego tabela 9 znajduje się poza rozdziałem „Wyniki”. Czy zdecydowała tu jedynie duża objętość tabeli, czy też ten imponujący i niewątpliwie niezwykle pracowity eksperyment wstępny jest efektem pracy zespołowej? Sprawy nie rozjaśnia do końca również opis tych eksperymentów w rozdziale „Dyskusja” na stronie 119. Nie umniejszałoby to znacząco wartości pracy, gdyby wyniki te nie były wykonane w całości przez Autorkę rozprawy doktorskiej, ale powinno to zostać wyjaśnione.

2. W przypadku doświadczeń przeprowadzonych na komórkach GBM12 stosowano dwa typy hodowli: 2D i 3D (neurosfer). Otrzymane wyniki wskazują, że wysoką cytotoksyczności PP1 zaobserwowano jedynie w przypadku hodowli 3D. Jest to ciekawy wynik, co Autorka słusznie podkreśla w Dyskusji. Wzbogacone w nowotworowe komórki macierzyste neurosfery są zapewne bliższe fizjologicznie komórkom w obrębie guza, być może także pod względem różnorodności fenotypu metabolicznego. W przypadku hodowli 3D wydawałoby się jednak celowe zastosowanie testów żywotności dedykowanych do takich hodowli (np. CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay firmy Promega). Testy te nie wymagają dysocjacji sfer do pojedynczych komórek przed pomiarem. Dodatkowo Autorka nie

komentuje, dlaczego nie badała wpływu PP1 na ustalone linie glejaków (np. LN-229) w hodowli 3D, a są one również zdolne do tworzenia neurosfer w hodowli zawieszinowej. Wydaje się ciekawe, czy również w tym przypadku dałoby się zaobserwować silniejsze/odmienne działanie cytotoksyczne pochodnych FF.

3. W rozdziale 5.1.2 rozprawy pokazana jest wpływ stężenia glukozy w pożywce na cytotoksyczne efekty związków PP. Jest to bardzo ciekawy wynik wart z pewnością publikacji i dalszej analizy. Należy zaznaczyć, że stężenie glukozy bardzo szybko spada w trakcie prowadzenia hodowli, oczywiście tempo tego spadku zależy od liczby komórek i ilości użytej pożywki oraz tempa proliferacji i aktywności metabolicznej komórek. Stężenie 1 g/L w pożywce nazwane jest niekiedy normoglikemicznym, a stężenie 4,5 g/L hiperglikemicznym. Zarówno omawiając wyniki jak i w odpowiednim fragmencie rozdziału „Dyskusja” nie zwrócono jednak uwagi, że są to stężenia wyjściowe glukozy w pożywce na początku eksperymentu, który trwał 48 lub nawet 96h. Dla pełniejszego zrozumienia obserwowanego efektu należałoby również zbadać tempo konsumpcji glukozy w obecności i bez pochodnych FF. Wydaje się, choć trudno to ocenić bez przeprowadzenia odpowiednich pomiarów, że w czasie 48h, aktywnie dzielące się komórki LN-229 zużywają całą obecną w pożywce glukozę niezależnie od tego, ile jej było na początku. Dlatego trudno taką sytuację porównywać z środowiskiem guza *in vivo*, gdzie mechanizmy homeostazy organizmu utrzymują stężenie glukozy na fizjologicznym poziomie, a jego cykliczne zmiany wynikają jedynie ze spożywania posiłków. Dodatkowo, w czasie analizy Ryc. 14D pokazującej silne zakwaszenie pożywki z 4,5 g/L glukozy w obecności PP1 nasuwa się pytanie, w jaki sposób komórki przeżyły w tak zakwaszonym środowisku następne 24h bez spadku żywotności (Ryc 14B)?

4. W rozdziale 5.1.1 znajduje się sformułowanie: „Najlepszą aktywność przeciwnowotworową wykazywał PP1”. Używanie przymiotników wartościujących „lepszy”, „gorszy” zamiast „większy”, „mniejszy” w kontekście wyników testów komórkowych nie wydaje się fortunate. Związek frazeologiczny „najlepsze właściwości przeciwnowotworowe” pojawia się kilkakrotnie, a powinien być zastąpiony przez np. „najsilniejsze działanie przeciwnowotworowe”.
5. Podpis do Ryc. 20 sugeruje, że żywotność astrocytów w pożywce AGM badana była po 72h, z opisu na tej samej stronie wynika, że inkubacja trwała 96h?
6. Napisy na Ryc. 45 są odwrócone.
7. W spisie skrótów PPAR – określany jest jako „receptor aktywujący proliferację peroksysomów”. W tekście pracy występuje zaś właściwa nazwa PPAR – „receptor aktywowany proliferatorami peroksysomów”. Te dwie nazwy mają inne znaczenie i nie powinny być używane zamiennie.
8. Praca napisana jest stylem naukowym, poprawnie stylistycznie, pewne błędy redakcyjne (kilkanaście literówek, powtórzenia wyrazów, bardzo nieliczne błędy ortograficzne i interpunkcyjne) nie odbierają pracy przejrzystości i nie obniżają jej wartości naukowej. Chciałabym jednak zasugerować, że terminy: kokultura (hodowla mieszana) i kultura komórkowa (hodowla komórkowa), choć często występujące w polskich tekstach o tematyce biologicznej, są jednak anglicyzmami, których lepiej unikać.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Joanny Stalińskiej dowodzi jej szerokiej wiedzy w zakresie biologii, pokazuje zdolność do prowadzenia pracy badawczej opartej na formułowaniu hipotez, dobraniu właściwych materiałów, metod i modeli *in vitro* oraz wykonaniu doświadczeń i interpretacji ich wyników w kontekście istniejącej literatury przedmiotu. W rozprawie udało się nie tylko udowodnić, że pochodne FF mogą mieć potencjał

antynowotworowy, gdyż działają na komórki glejaka wielopostaciowego cytotoksycznie, są rozpuszczalne w wodzie i mogą potencjalnie przekraczać barierę krew-mózg. Ponadto, wyniki opisane w rozprawie w istotny sposób poszerzają obecny stan wiedzy o metabolizmie komórek glejaka wielopostaciowego, mają duży potencjał publikacyjny i z pewnością zainteresują szerokie grono specjalistów. Patrząc szerzej, stanowią też argument na korzyść twierdzenia, iż ingerencja w metabolizm energetyczny komórek glejaka wielopostaciowego może stać się w przyszłości podstawą skutecznej terapii tego niezwykle złośliwego i obecnie nieuleczalnego nowotworu.

Rozprawa Pani mgr Joanny Stalińskiej spełnia zatem warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. *O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455). W związku z powyższym z pełnym przekonaniem wnioskuję do Szanownej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Joanny Stalińskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Kraków, 16.08.2023

Melponata Bendulowa