



Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW  
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

Warszawa, 16.01.2023 r.

dr hab. Małgorzata Gajewska, prof. SGGW  
Zakład Biochemii i Dietetyki  
Katedra Nauk Fizjologicznych  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Ewelina Siwiak-Niedbalska pt. „Ocena mechanizmów cytotoksycznego współdziałania inhibitorów glikolizy oraz inhibitorów deacetylaz histonów (HDAC) w modelu in vitro glejaka wielopostaciowego” wykonanej w Samodzielnej Pracowni Genetyki i Biologii Molekularnej, Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie pod kierunkiem promotora dr hab. n. med. inż. Beata Pająk, prof. WIHE oraz promotora pomocniczego dr n. rol. Anna Jaśkiewicz.**

Na przestrzeni ostatnich lat obserwowany jest wzrost zachorowalności na pierwotne złośliwe guzy ośrodkowego układu nerwowego, a nowotwory pochodzenia glejowego należą do najczęściej diagnozowanych typów tych nowotworów. Glejak wielopostaciowy (GBM) to szczególnie złośliwa postać pierwotnego guza mózgu. Mediana przeżywalności pacjentów po usłyszeniu diagnozy wynosi zaledwie 15 miesięcy. W leczeniu glejaków wielopostaciowych najczęściej stosowanym schematem jest protokół Stuppa, bazujący na połączeniu radioterapii z chemioterapią temozolomidem – związkami alkilującym z grupy triazenów, którego działanie polega na wewnątrzkomórkowej przemianie do metabolitu pośredniego – metylo-triazenu-1-imidazolo-4-karboksyamidu, prowadzącego do metylacji nukleotydów guaninowych w DNA. Konsekwencją metylacji guaniny jest przerwanie ciągłości struktury DNA, z powodu nieprawidłowego parowania zasad azotowych w kwasie nukleinowym. Następstwem są zaburzenia w syntezie DNA aktywujące programowaną śmierć komórek nowotworowych na drodze apoptozy. Niestety skuteczność temozolomidu jest ograniczona, z powodu występowania u około 50 % pacjentów z GBM nadekspresji enzymu metylotransferazy O-6-metyloguaniny, biorącego udział w mechanizmach naprawy DNA, co znosi cytotoksyczne działanie tego cytostatyku. Dlatego w ośrodkach naukowych na całym świecie prowadzone są badania nad nowymi chemioterapeutykami lub możliwością zastosowania terapii z użyciem kombinacji tych leków, co przyniosłoby przełom w leczeniu pacjentów i znacząco przyczyniłoby się do zwiększenia ich przeżywalności. W badaniach sprawdzane są różne strategie eliminacji komórek GBM, m.in. poprzez wykorzystanie:

- immunoterapii z użyciem przeciwciał monoklonalnych wiążących czynniki wzrostu śródbłonnki naczyń (VEGF) - bawacizumab,
- inhibitorów dla receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych, do których należą receptory wiążące VEGF – regorafenib.

Do nowych strategii zalicza się również wykorzystanie szczególnego metabolizmu glukozy w komórkach glejaka wielopostaciowego, opartego przede wszystkim na glikolizie tlenowej, czyli wzmożonym pobieraniu glukozy oraz intensywnej glikolizie do mleczanu z jednoczesnym



Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW  
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

ograniczeniem fosforylacji oksydacyjnej nawet w obecności tlenu. Taka forma metabolizmu jest cechą szybko proliferujących komórek, dlatego obserwowana jest w okresie zarodkowym oraz w tworzących się guzach nowotworowych. Właśnie tym zagadnieniem zajęła się w swojej pracy doktorskiej mgr inż. Ewelina Siwiak-Niedbalska, stawiając sobie za cel zbadanie możliwości eliminowania komórek nowotworowych glejaka wielopostaciowego poprzez jednoczesne zastosowanie inhibitorów glikolizy (2-deoksy-D-glukozy i jej pochodnej - WP1122) oraz inhibitorów deacetylaz histonów (maślanu sodu, walproinianu sodu) wykorzystując model *in vitro* dwóch linii komórkowych: U-87 i U-251. W badaniach wykorzystana została również nowa pochodna 2-DG: WP1234 wykazująca dwutorowe działanie poprzez jednoczesne hamowanie metabolizmu glukozy oraz aktywności deacetylaz histonów, co jest elementem nowatorskim w tej pracy. Tematyka wybrana przez Doktorantkę jest więc ze wszelkich miar zasadna, a wykonane badania przedkliniczne mogą potencjalnie przyczynić się do znalezienia nowych rozwiązań terapeutycznych w leczeniu glejaka wielopostaciowego.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Eweliny Siwiak-Niedbalskiej została przygotowana w formie monografii naukowej liczącej 150 stron. Układ dysertacji jest tradycyjny i zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, spis treści, szczegółowy wykaz stosowanych skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo oraz dołączony na końcu wykaz rycin i tabel. Kontrowersyjny zdaniem Recenzentki jest fakt, iż rozprawa doktorska Pani mgr inż. Eweliny Siwiak-Niedbalskiej w dużej mierze oparta jest na trzech publikacjach zespołu naukowego prof. Beaty Pająk, w których Doktorantka jest drugim autorem, a prof. Beata Pająk jest pierwszym autorem:

1. Pająk B, Siwiak E, Sołtyka M, Priebe A, Zieliński R, Fokt I, Ziemniak M, Jaśkiewicz A, Borowski R, Domoradzki T, Priebe W. 2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents. *Int J Mol Sci.* **2019 Dec 29**;21(1):234. doi: 10.3390/ijms21010234.
2. Pająk B, Siwiak-Niedbalska E, Jaśkiewicz A, Sołtyka M, Zieliński R, Domoradzki T, Fokt I, Skóra S, Priebe W. Synergistic Anticancer Effect of Glycolysis and Histone Deacetylases Inhibitors in a Glioblastoma Model. *Biomedicines.* **2021 Nov 23**;9(12):1749. doi: 10.3390/biomedicines9121749.
3. Pająk B, Siwiak-Niedbalska E, Jaśkiewicz A, Sołtyka M, Domoradzki T. WP1234-A Novel Anticancer Agent with Bifunctional Activity in a Glioblastoma Model. *Biomedicines.* **2022 Nov 3**;10(11):2799. doi: 10.3390/biomedicines10112799.

Pierwszy z wymienionych artykułów, opublikowany w *International Journal of Molecular Sciences* stanowi przegląd aktualnej literatury dotyczącej zastosowania 2-deoksy-D-glukozy oraz jej pochodnych w diagnostyce oraz terapii przeciwnowotworowej. Został napisany przez 11 współautorów, jednak nie podano informacji na temat szczegółowego udziału współautorów w przygotowaniu tekstu. Artykuł ten jest jedynym spośród trzech wymienionych powyżej, który został zacytowany przez Panią mgr inż. Ewelinę Siwiak-Niedbalską w tekście rozprawy. Również w opisie ryciny 2 dysertacji, będącej polską wersją ryciny 2 omawianego artykułu jest wyraźne odniesienie do tej pozycji literaturowej, która w spisie piśmiennictwa oznaczona jest numerem 74. Ww. artykuł stanowił również wzorzec ryciny 5 w dysertacji, co zostało zaznaczone w opisie pod rysunkiem. Brakuje natomiast takiej informacji w opisie tabeli II zawartej w rozprawie doktorskiej, która także



Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW  
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

jest polską wersją tabeli nr 1 w artykule przeglądowym opublikowanym w 2019 r. w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*.

W rozprawie doktorskiej zabrakło natomiast cytowania drugiego artykułu, wydanego w czasopiśmie *Biomedicines* w listopadzie 2021 r., a więc przed złożeniem rozprawy do recenzji. Artykuł ten jest artykułem oryginalnym, opisującym wyniki badań nad molekularnymi mechanizmami współdziałania inhibitorów glikolizy (2-DG, WP1122) oraz inhibitorów deacetylaz histonów (maślanu sodu, walproinianu sodu) w komórkach glejaka wielopostaciowego, co stanowi trzon recenzowanej pracy doktorskiej. W dysertacji mgr inż. Eweliny Siwiak-Niedbalskiej ryciny oraz tabele przedstawiające wyniki dotyczące tego zagadnienia są polską wersją rycin zawartych w publikacji z 2021 r. W opisie udziału autorów w przygotowaniu ww. artykułu naukowego znajduje się informacja o udziale Doktorantki w badaniach eksperymentalnych („investigation”) oraz pracy edytorskiej nad tekstem i poprawkach po recenzji („writing—review and editing”), jednak dominujący wkład w powstanie tego artykułu miała pierwsza autorka, prof. Beata Pająk, która nie tylko była autorką koncepcji badań, ich koordynatorką oraz administratorką projektu, ale również brała udział w samych badaniach, miała nadrzędny udział w ich interpretacji, oraz była autorką oryginalnej wersji tekstu. Dlatego nasuwa się pytanie, które wyniki opisane zarówno w dysertacji jak i w artykule opublikowanym w 2021 r. w czasopiśmie *Biomedicine* stanowią oryginalną pracę twórczą Doktorantki?

Wyniki badań dotyczących molekularnych mechanizmów działania pochodnej 2-DG: WP1234 zostały z kolei opisane w artykule opublikowanym w czasopiśmie *Biomedicines* w 2022 r. Ten artykuł został wysłany do redakcji już po złożeniu przez mgr Ewelinę Siwiak-Niedbalską rozprawy doktorskiej do recenzji, w październiku 2022 roku. Artykuł został przyjęty do druku 3 listopada 2022. Dlatego Recenzentka rozumie, że jego zacytowanie w pracy było niemożliwe. Pozostaje jednak pytanie dotyczące udziału Doktorantki w tej publikacji, ponieważ z opisu podanego w ww. artykule wynika, że udział ten znów ograniczał się do pracy laboratoryjnej oraz pracy edytorskiej nad tekstem i poprawkach po recenzji, choć tym razem pojawia się również informacja na temat udziału w wizualizacji („visualization”), co można chyba interpretować jako przygotowanie graficznej strony artykułu. Ponieważ w rozprawie doktorskiej aż 10 z 12 rycin (w dysertacji rysunki o numerach: 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 48, 49, 50) stanowi polską wersję językową rycin zawartych w publikacji z 2022 r., Recenzentka również prosi o uściślenie roli Doktorantki w pozyskiwaniu opisywanych wyników badań.

Pomimo przedstawionych powyżej wątpliwości Recenzentka pozytywnie ocenia przygotowaną rozprawę doktorską, która została napisana starannie i posiada dużą wartość merytoryczną. We wstępie Doktorantka przedstawia klasyfikację glejaków oraz szczegółową charakterystykę glejaka wielopostaciowego, uwzględniając informacje na temat szlaków glikolitycznych, które są punktem wyjścia do przeprowadzonych w pracy badań. Recenzentka pragnie jednak zwrócić uwagę na zbyt częste używanie anglojęzycznych terminów lub skrótów w odniesieniu do procesów i reakcji dobrze poznanych i posiadających ugruntowaną terminologię w języku polskim. Szlak glikolityczny został odkryty w pierwszej połowie XX wieku i obecnie należy do podstawowych procesów metabolicznych opisywanych w podręcznikach do Biochemii. Wszystkie nazwy produktów pośrednich i końcowych oraz enzymów katalizujących poszczególne



Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW  
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

reakcji w szlaku są dobrze znane i w polskich podręcznikowych opisach bardzo rzadko stosuje się skróty nazw. Dlatego podawanie w tekście, w nawiasach, anglojęzycznego nazewnictwa wraz ze skrótami oraz stosowanie w dalszych rozdziałach skrótowych nazw enzymów w odniesieniu np. do dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu nie było konieczne. Generalnie Doktoranta miała tendencję do stosowania skrótów angielskich nazw zamiast posługiwać się prawidłową polską terminologią. Na przykład w pracy pojawia się dużo częściej skrót BBB niż polska nazwa bariera krew-mózg, która nie jest terminem skomplikowanym, a ułatwiłaby czytelnikowi odbiór treści pracy. Podobnie jest ze skrótami NADH oraz NAD<sup>+</sup>, które w tekście wstępu posiadają w nawiasach rozwinięcia nazw angielskich, zamiast dobrze znanych nazw polskich, które można znaleźć jedynie w wykazie skrótów. Bardzo wartościowe są natomiast rozdziały wstępu dotyczące terapii glejaka wielopostaciowego oraz związków zastosowanych w pracy doktorskiej. Wstęp zawiera również 11 rycin oraz 4 tabele, które doskonale korespondują z tekstem stanowiąc dobre podsumowanie omawianych zagadnień.

W kolejnym rozdziale autorska przedstawiła szczegółowe cele badawcze pracy, które zostały sformułowane prawidłowo. Rozdział *Cel pracy* rozpoczyna się jednak zdaniem wskazującym na opisaną wcześniej hipotezę badawczą dotyczącą możliwości eliminowania komórek nowotworowych glejaka wielopostaciowego poprzez jednoczesne zastosowanie inhibitorów glikolizy oraz deacetylaz histonów. Recenzentka pragnie zauważyć, że pod koniec wstępu taka hipoteza badawcza nie została sformułowana w sposób jednoznaczny i czytelny. Jedynie krótki podrozdział 1.13. pt. „Terapia kombinowana w onkologii” może stanowić pewną formę hipotezy badawczej. Zdaniem recenzentki, to jednak nie wystarczy i hipoteza badawcza powinna zostać przedstawiona w sposób jasny w drugim rozdziale, poprzedzając wypunktowane szczegółowe cele badawcze.

W rozdziale *Materiały i metody* mgr inż. Ewelina Siwiak-Niedbalska szczegółowo opisuje zastosowaną w pracy doktorskiej metodykę, która oparta została na schemacie doświadczalnym polegającym na oznaczaniu cytotoksyczności użytych chemioterapeutyków wobec komórek GBM linii U-87 oraz U-251 na podstawie wyników testów *in vitro* z użyciem MTS, BrdU, aneksyny V, jak również na podstawie pomiaru natężenia biosyntezy białka przy pomocy sulforodaminy B, czy poziomu ekspresji białek apoptotycznych: Bcl-2, Bad, Bax, prokaspazy-3. Wykonana została również analiza procesu autofagii w komórkach z wykorzystaniem techniki Western-blot oraz mikroskopii elektronowej oraz sprawdzano aktywność metaboliczną komórek wykorzystując komercyjnie dostępne zestawy do oznaczenia stężenia kwasu mlekowego oraz ATP. Nasuwa się pytanie, czy nie byłoby zasadne prowadzenie tych badań równoległe na modelu *in vitro* prawidłowych komórek glejowych? Biorąc pod uwagę, że wybór testowanych związków chemioterapeutycznych opiera się przede wszystkim na różnicach w szlakach metabolicznych pomiędzy komórkami nowotworowymi oraz prawidłowymi, dołączenie dodatkowej, lub dodatkowych linii komórkowych astrocytów, oligodendrocytów lub hodowli pierwotnych komórek macierzystych/prekursorowych dla komórek gleju, mogłoby bezpośrednio wykazać selektywność działania badanych związków. Recenzentka prosi o ustosunkowanie się do tej uwagi oraz zaproponowanie możliwego do użycia modelu prawidłowych komórek, które mogłyby być włączone w schemat prowadzonych badania *in vitro*. Dodatkowo, należy zwrócić uwagę na pojawiające się również w tym rozdziale nazwy zaczerpnięte bezpośrednio z języka angielskiego, które mają swoje poprawne odpowiedniki w języku polskim. I tak np. słowo „pelet” można zastąpić polskim słowem „osad”, a słowo „falkony” opisujące stożkowe



Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW  
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

próbówki wirówkowe, stanowi żargon laboratoryjny, który nie powinien być używany w rozprawie doktorskiej. Ponadto na stronie 47 podana została jedynie angielską nazwą ośrodka naukowego, w którym zsyntetyzowane zostały chemioterapeutyki badane w pracy. Zdaniem Recenzentki wskazane byłoby użycie polskiego tłumaczenia nazwy tego ośrodka naukowego, podając oryginalną nazwę w nawiasie. W rozdziale *Materiały i metody* można również znaleźć inne niefortunne zwroty, które wymagałyby korekty, np.:

Str. 47 - „zateżone roztwory wodne...” – poprawna forma to „stężone roztwory wodne..”

Str. 48 – „pelet rozbijano w 5 mL świeżej pożywki” – poprawna forma to „osad zawieszano w 5 mL świeżej pożywki”

Str. 48 – „Po 24 h, po przyklejeniu się do podłoża komórek, **odsysano medium hodowlane** i zastępowano je medium z dodatkiem badanych czynników doświadczalnych w odpowiednich stężeniach z przygotowanych wcześniej stoków” – w tym zdaniu lepiej byłoby użyć określenia „...**usuwano pożywkę hodowlaną** i zastępowano ją **pożywką** z dodatkiem badanych czynników doświadczalnych”

Str. 54 – „Supernatant zawierający białka całokomórkowe” – wystarczyłoby określenie „zawierający białka wyizolowane z komórek”

Str. 55 – „W drugim etapie dodanie Lysine Developer powoduje barwną reakcję” – poprawna forma to „W drugim etapie dodanie odpowiedniego buforu określanego przez producenta jako „Lysine Developer” indukuje reakcję barwną lizyny poddanej deacetylacji w obecności deacetylaz histonów (HDAC)”

Str. 56 – „Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli pozytywnej – jako % ctrl” – w rzeczywistości w wynikach pokazanych na wykresach zawartych na rycinach 29 i 46 podpisy osi Y zawierają określenie „Aktywność HDAC [% kontroli], a nie % ctrl.

Ponadto, w podrozdziałach 3.7.2. oraz 3.7.3. znajduje się błędna informacja o przedstawieniu wyników jako „% żywotności komórek kontrolnych”. W rzeczywistości w przypadku pomiaru natężenia biosyntezy białka z SRB wyniki przedstawiono na rycinach 26 i 41 jako syntezę białka w odniesieniu do warunków kontrolnych (opis osi Y brzmi: „Synteza białka [% kontroli]), natomiast w przypadku pomiaru aktywności proliferacyjnej komórek, pokazanej na rycinach 25 i 40 wyniki przedstawiono jako aktywność proliferacyjną w odniesieniu do warunków kontrolnych, a opis osi Y brzmi: „Proliferacja [% kontroli]”.

Należy podkreślić, że wymienione błędy stylistyczne i edytorskie nie wpływają znacząco na wartość merytoryczną tego rozdziału, a dołączone opisy technik laboratoryjnych pozwalają powtórzyć omawiane doświadczenia przez osoby zainteresowane wykonaniem podobnych analiz.

Następny rozdział dysertacji, obejmujący 38 stron tekstu, starannie opisuje wyniki przeprowadzonych doświadczeń, a do opisu zostały dołączone zestawienia wyników w formie 36 rycin i 5 tabel. Zaprezentowane wyniki można podzielić na trzy części, choć Autorka nie zaznaczyła tego wyraźnie w numeracji podrozdziałów. Początkowo zostały opisane wyniki testów cytotoksyczności dwóch pochodnych glukozy: 2-DG oraz WP1122 oraz dwóch inhibitorów deacetylaz histonów: maślanu sodu i walproinianu sodu. Wykazano zależne od dawki oraz czasu istotne hamowanie żywotności, aktywności proliferacyjnej oraz aktywności syntezy białka w komórkach linii U-87 oraz U-251 pod wpływem zastosowanych związków. Jednocześnie



**Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW**  
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

obserwowano istotny wzrost liczby komórek apoptotycznych, co potwierdzało wyniki uzyskane we wcześniejszych testach. Zgodnie z oczekiwaniami acetylowana pochodna 2-deoksy-D-glukozy (WP1122) wykazywała istotnie wyższy efekt cytotoksyczny, a wartość stężenia hamującego IC50 dla tego związku była ponad dwukrotnie niższa niż dla nieacetylowanej 2-deoksy-D-glukozy. W przypadku obu badanych inhibitorów HDAC aktywność cytotoksyczna była zbliżona. W warunkach naśladujących niedotlenienie komórek GBM poprzez chemiczną aktywację białka HIF-1 $\alpha$  w obecności dimetylooksaliloglicyny (DMOG) oraz Rodaminy 123 jedynie 2-DG powodowała niewielkie, choć statystycznie istotne obniżenie żywotności komórek w porównaniu do warunków normoksji, natomiast wyniki testu MTS dla komórek traktowanych pozostałymi trzema chemioterapeutykami nie różniły się znacząco w warunkach hipoksji oraz normoksji. Ta część pracy stanowi potwierdzenie obserwacji opublikowanych wcześniej przez inne ośrodki naukowe.

Niezwykle interesujące były natomiast wyniki pokazujące efekt jednoczesnego podawania pochodnych glukozy (2-DG lub WP1122) oraz inhibitorów deacetylaz histonów (maślanu sodu lub walproinianu sodu) w celu wywołania poprawy efektu cytotoksycznego oraz możliwości zmniejszenia dawki stosowanych chemioterapeutyków w terapii kombinowanej. Doktorantka potwierdziła, że jednoczesne modulowanie procesu glikolizy oraz zahamowanie aktywności HDAC, prowadzące do zmian transkrypcji genów pro- i antyapoptotycznych powoduje zwiększenie potencjału cytotoksycznego obu grup inhibitorów i skuteczniejszą eliminację komórek GBM. Ponadto, Pani mgr inż. Ewelina Siwiak-Niedbalska przeprowadziła szereg analiz statystycznych w celu oceny rodzaju interakcji pomiędzy inhibitorami glikolizy oraz inhibitorami deacetylaz histonów stosując metodę efektu mediany według Chou i Talalay'a. Wyniki tych analiz, przedstawionych w tabeli VIII i IX, udowadniają synergistyczne działanie zastosowanych związków, wskazując na duży potencjał proponowanej terapii kombinowanej. Należy podkreślić, że dalsze badania przedkliniczne, z użyciem zwierząt laboratoryjnych będą konieczne, w celu weryfikacji wyników otrzymanych w zastosowanym modelu *in vitro*. W tym miejscu Recenzentka pragnie zwrócić uwagę na drobne błędy edytorskie w rozdziale 4.13. W opisach do tabel VIII oraz IX dołączona jest informacja o współczynniku korelacji Parsona. Po pierwsze ten współczynnik nie został uwzględniony w tabelach, a po drugie jego prawidłowa nazwa to współczynnik korelacji Pearsona. Wartości współczynnika korelacji zostały co prawda przedstawione w tabelach S2 oraz S3, stanowiących suplement do artykułu opublikowanego w czasopiśmie *Biomedicines* w 2021 r., jednak artykuł ten nie został zacytowany w dysertacji. Ponadto rzymska cyfra IX pisana jest bez znaku „V” poprzedzającego znak „I” oraz „X”. Błąd ten był konsekwentnie powielany w tekście rozdziału 4.13., w numeracji tej tabeli jak również w wykazie tabel dołączonym na końcu pracy.

Najbardziej nowatorską część pracy doktorskiej stanowią obiecujące wyniki cytotoksyczności nowej pochodnej 2-deoksy-D-glukozy o nazwie WP1234, posiadającej w swojej strukturze resztę etylomaślanu, co powoduje iż wewnątrzkomórkowe działanie tego związku powinno być dwutorowe: hamując zarówno proces glikolizy, jak i aktywność deacetylaz histonów. Doktorantka udowodniła istotny efekt cytotoksyczny badanego chemioterapeutyku na komórki linii U-87 oraz U-251, przy zastosowaniu dawek znacznie niższych niż w przypadku wcześniej analizowanych związków. W celu łatwiejszego porównania stosowanych dawek, należało jednak ujednoclić jednostki, w których wyrażone zostały stężenia stosowanych w pracy chemioterapeutyków, więc dla WP1234 stężenia



**Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW**  
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

powinny być podane również w mM, a nie w  $\mu$ M. W przypadku badań dotyczących procesu apoptozy oprócz testu cytometrycznego z zastosowaniem ankesyny V Doktorantka wykonała analizę Western-blot poziomu pro-kaspazy-3. Recenzentka pragnie zapytać co spowodowało wybór przeciwciał wykrywających jedynie nieaktywną formę tego enzymu efektorowego szlaku apoptozy? Na rynku dostępne są również przeciwciała skierowane swoiście przeciw formie aktywnej (ciętej) lub umożliwiające detekcję zarówno formy prokaspazy jak i krótszej formy aktywnej kaspazy-3. Użyte w pracy przeciwciała pozwalają jedynie pośrednio wnioskować o aktywacji tego enzymu, poprzez obserwację zmniejszającej się grubości prążka proenzymu. Ponieważ cytometryczna analiza liczby komórek apoptotycznych z użyciem aneksyny V wyraźnie wskazywała na zachodzący proces śmierci apoptotycznej, wyniki przedstawione na rycinie 44 nie wnoszą dodatkowych, istotnych informacji do przeprowadzanych badań.

W rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Eweliny Siwiak-Niedbalskiej opisane zostały również wyniki analiz świadczących o aktywacji procesu autofagii w komórkach U-87 oraz U-251 pod wpływem testowanych związków. Tę część badań uważam za najmniej dopracowaną. Zachodzący w komórkach GBM proces autofagii udowodniono na podstawie analizy poziomu białka MAP1-LC3 oraz stosując mikroskopię elektronową, umożliwiającą zobrazowanie tworzących się wakuoli autofagicznych. Na podstawie tych badań nie można jednak wyciągać wniosków na temat szlaków sygnałowych indukujących autofagię pod wpływem stosowanych chemioterapeutyków, ponieważ nie sprawdzono metodą Western-blot poziomu wybranych białek zaangażowanych w szlaki pośredniczone przez kinazę AMPK, czy mTOR, ani białek wskazujących na aktywację stresu siateczki śródplazmatycznej lub odpowiedzi komórkowej na niesfałdowane białka (m.in. IRE1, PERK, ATF6, czy CHOP). Nie było zaskoczeniem, iż autofagia aktywowana była stosunkowo szybko po podaniu badanych związków, jako wewnątrzkomórkowy proces umożliwiający przeżycie, natomiast komórki podlegały śmierci na drodze apoptozy. Ponadto, w opisie wyników przedstawionych na rycinach 33 oraz 49 brakuje wyraźnego zaznaczenia, że w interpretacji wyników brano pod uwagę białko LC3-II, czyli właściwy marker zachodzącego procesu autofagii. Dopiero w dyskusji pojawia się ta informacja w odniesieniu do badań innych zespołów. Ponadto, wyniki analiz mikroskopowych przedstawione zostały wyłącznie dla linii U-87. Czym spowodowane było nie przeprowadzenie podobnych analiz dla drugiej linii GBM? Dlaczego w przypadku chemioterapeutyków: 2-DG, WP1122, maślanu sodu oraz walproinianu sodu analizę ultrastruktury komórek linii U-87 przeprowadzono po 24h inkubacji, natomiast stosując związek WP1234 analiza została wykonana już po 8h i 12h, chociaż pozostałe analizy wykonano w analogicznych punktach czasowych? Recenzentka prosi o komentarz.

Pomimo uwag krytycznych Recenzentka pragnie podkreślić, że otrzymane w toku badań wyniki są trafnie interpretowane, czego dowodem jest dobrze przeprowadzona w rozdziale 5 dyskusja, stanowiąca podsumowanie wykonanych badań na tle dostępnej, zwykle najbardziej aktualnej literatury. Z 322 zacytowanych artykułów naukowych, aż 148 pochodzi z ostatnich 5 lat przed złożeniem rozprawy doktorskiej (lata 2018-2022). Dyskusja potwierdza dobre poznanie tematyki badawczej przez Panią mgr inż. Ewelinę Siwiak-Niedbalską oraz dojrzałą interpretację otrzymanych wyników. Krytyczna uwaga odnosi się jedynie do częstego nawiązywania przez Doktorantkę do badań dotyczących zastosowania omawianych chemioterapeutyków w innych



**Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW**  
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

rodzajach nowotworów, nie związanych z tematyką pracy. Tego typu informacje zostały już wcześniej przedstawione we wstępie dysertacji, więc dyskusja powinna zdaniem Recenzentki dotyczyć głównie możliwości zastosowania badanych związków w leczeniu glejaków.

Na końcu rozprawy doktorskiej Doktorantka przedstawiła 4 prawidłowo sformułowane wnioski, które w sposób syntetyczny podsumowują główne osiągnięcia przeprowadzonych badań.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Eweliny Siwiak-Niedbalskiej ma wysoką wartość merytoryczną. Szeroki zakres przeprowadzonych badań i wykorzystane metody analityczne wymagały dużego nakładu pracy i umiejętności Doktorantki. Pomimo przedstawionych w recenzji uwag krytycznych, uważam, że otrzymane wyniki wskazują, że przeprowadzone badania na zastosowanych inhibitorach glikolizy oraz inhibitorach deacetylaz histonów są obiecującym kierunkiem badań przedklinicznych i powinny być kontynuowane w celu weryfikacji możliwości ich wykorzystania jako nowej strategii terapeutycznej w leczeniu glejaka wielopostaciowego.

#### **Wniosek końcowy**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Eweliny Siwiak-Niedbalskiej pt. „Ocena mechanizmów cytotoksycznego współdziałania inhibitorów glikolizy oraz inhibitorów deacetylaz histonów (HDACi) w modelu in vitro glejaka wielopostaciowego” odpowiada warunkom określonym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Dlatego wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Lotniczej w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Eweliny Siwiak-Niedbalskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

KIEROWNIK  
ZAKŁADU BIOCHEMII I DIETETYKI  
  
/ Dr hab. Małgorzata Gajewska, prof. SGGW /