

Łódź, 04.09.2023 r.

Dr hab. n. med. prof. U.M. Joanna Sikora

Kierownik Katedry Chemii Medycznej

i Zakładu Chemii Bionieorganicznej

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Biesiekierskiej,

pt: „Analiza możliwości wykorzystania ciał ketonowych i transferazy bursztynyl-CoA:3-ketokwas-CoA jako potencjalnych narzędzi w terapii raka szyjki macicy w warunkach in vitro”

„Analysis of the possibility of using ketone bodies and transferase succinyl-CoA:3-ketoacid-CoA as potential tools in the treatment of cervical cancer in vitro”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Biologii Nowotworów i Epigenetyki Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Anety Balcerzyk, prof. UŁ

Zasadność podjęcia tematu oraz ocena formalna pracy

Tradycja stosowania w leczeniu różnych schorzeń diet terapeutycznych lub diet leczniczych jest znana i stosowana wspomagająco od dziesięcioleci. Z przyczyn zdrowotnych modyfikowana jest podaż składników energetycznych i substancji odżywczych w taki sposób aby osiągnąć określone działanie terapeutyczne w czasie stosowania danego schematu żywieniowego. Diety tego rodzaju są często nieodpowiednio zbilansowane w stosunku do potrzeb żywieniowych zdrowego człowieka i są dla niego szkodliwe, ale ich okresowe stosowanie zdecydowanie ma uzasadnienie terapeutyczne i znajduje potwierdzenie w wynikach wielu badań naukowych. Od lat znane jest zastosowanie dietoterapii w leczeniu chorób, których pierwotną przyczyną jest niewłaściwa lub źle zbilansowana dieta np.: dieta ubogoenergetyczna w leczeniu otyłości, niskoniskosodowa w nadciśnieniu tętniczym, czy niskotłuszczowa w chorobie serca. W tym przypadku, mechanizmy biochemiczne związane ze stosowaniem diety są znane i dobrze opisane.

W ostatnich latach, pojawiają się badania o zupełnie nowym podejściu do stosowania modyfikowanych programów żywieniowych, które prowadzą do wystąpienia tzw.: „przeprogramowania metabolicznego organizmu” – procesu, który może odgrywać ważną rolę w kontekście leczenia nowotworów. Istnieje teoria, że dieta ketogeniczna może być korzystna, ponieważ nowotwory komórek rakowych wykorzystują glukozę jako główne źródło energii. W ketozie stężenie glukozy we krwi jest niskie, co może ograniczać dostępność glukozy dla komórek nowotworowych. Jednakże, badania nad wpływem diety ketogenicznej na leczenie nowotworów są wciąż w fazie intensywnych badań, a ich wyniki nie są jednoznaczne. Dlatego uważam, że Doktorantka dobrze wpisała się swoimi badaniami w aktualne trendy poszukiwań naukowych a wyniki Jej pracy mogą przyczynić się do poszerzenia wiedzy na temat biochemicznych i molekularnych podstaw stosowania dietoterapii, opartej na wywołaniu ketozy, w leczeniu chorób nowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem terapii raka szyjki macicy.

Praca doktorska ma postać klasycznej, książkowej dysertacji. Została przedstawiona na 109 stronach typowego maszynopisu podzielonego na rozdziały z licznymi podrozdziałami. W niespełna 25 stronicowym wstępie Doktorantka przedstawiła podstawowe informacje dotyczące makroskładników niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu ludzkiego oraz produkcji energii, biochemię i fizjologię komórek nowotworowych oraz aktualny stan wiedzy dotyczący raka szyjki macicy. W dalszej części wstępu znajduje się ciekawy przegląd literaturowy dotyczący roli ciał ketonowych i diety ketogenicznej w progresji i leczeniu nowotworów.

Kolejny rozdział zawiera cel pracy, z wyszczególnionymi trzema celami szczegółowymi. Autorka nie stawia klasycznych hipotez badawczych, a zaplanowane działania mają raczej charakter ogólny, których zadaniem jest ocena potencjalnej roli wybranych mechanizmów w regulacji potencjału metastatycznego komórek raka szyjki macicy. Jednak sam cel został jasno sformułowany a lektura całości rozprawy tylko potwierdza konsekwentną realizację tego planu działania zarówno w części doświadczalnej, jak i dyskusji.

W trzecim rozdziale znajduje się opis przygotowywania modeli badawczych, tj.: komórek HeLa z (1) wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu OXCT1 i (2) nadekspresją genu OXCT1 oraz (3) komórek HeLa hodowanych w zmiennych warunkach glikemicznych. Ten rozdział jest nieco nietypowy, bo nie do końca wiadomo czy to już część doświadczalna pracy, wykonywana przez Doktorantkę, czy tylko teoretyczny opis przygotowania stosowanych w pracy modeli *in vitro*. Szczególnie, że sama Autorka pisze, że *”Komórki HeLa z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu OXCT1 i nadekspresją genu OXCT1 zostały przygotowane przez mgr. Macieja Studziana (Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki, UŁ), a prezentowane wyniki są częścią manuskryptu 2 przygotowywanego do publikacji”* – warto by było doprecyzować jaki jest indywidualny

wkład Doktorantki, w opracowanie modeli (czy uczestniczyła w ich tworzeniu) czy tylko zastosowała opracowany warsztat badawczy. Sam opis zastosowanych modeli jest sporządzony w sposób poprawny, zrozumiały i uwzględnia weryfikację poprawności opracowanej metody.

Część doświadczalna, zarówno rozdział „Materiał biologiczny wykorzystywany w badaniach” jak i „Metody badawcze zastosowane w pracy” zostały opisane szczegółowo i precyzyjnie, w sposób umożliwiający odtworzenie poszczególnych eksperymentów, co jest dużą wartością dodaną tej rozprawy. Sugerowałabym jednak używanie aktualnie obowiązujących jednostek międzynarodowego układu SI czyli mmol/L zamiast mM.

Doktorantka do realizacji postawionego celu badawczego zastosowała bardzo szeroki wachlarz technik badawczych z zakresu badań biologicznych, biochemicznych, biologii molekularnej, genetyki i immunochemii. Niewątpliwie, wymagało to od Doktorantki dużego nakładu pracy i zaangażowania, zarówno w opanowanie warsztatu badawczego, jak i samego czasu na przeprowadzenie wszystkich niezbędnych analiz. W tym miejscu prosiłabym o doprecyzowanie przez Doktorantkę zapisu z ostatniego podrozdziału (5.13) tej części tj. Statystyka dotyczącej przyjętej metodologii wykonywania pomiarów, czyli „*Eksperymenty były przeprowadzane w co najmniej trzech niezależnych powtórzeniach*” – czy to oznacza że badania były prowadzone w niezależnych trzech eksperymentach a pomiary dla danego eksperymentu były prowadzone w duplikatach lub triplikatach? Czy też Autorka przyjęła inną strategię badawczą.

Na kolejnych 42. stronach rozprawy Doktorantka przedstawiła otrzymane wyniki badań wraz ich omówieniem, obszerną dyskusję oraz podsumowanie wyników i wnioski. Rozdział 9. zatytułowany „Uwagi podsumowujące”, jest kolejny nietypowym dla rozpraw doktorskich elementem, aczkolwiek bardzo ciekawym i świadczącym o pewnej dojrzałości naukowej Autorki. Rozdział zawiera krytyczną ocenę otrzymanych wyników badań, które zostały zauważone i stały się przedmiotem rozważań, a w przyszłości mogą być punktem wyjścia dla nowych eksperymentów. Opis wyników badań został wzbogacony o liczne kolorowe ryciny, wykresy i zdjęcia, co znacząco podnosi walory estetyczne pracy. Niestety w wersji papierowej są one dość małe, przez co są problemy z ich odczytaniem i interpretacją ale w wersji elektronicznej (PDF) można w pełni docenić ich wartość.

Praca zawiera także wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis literatury, ocenę bibliometryczną aktywności naukowej Doktorantki wraz ze spisem publikacji, rozdziałów w monografiach oraz doniesień konferencyjnych i plakatowych.

Autorka zamieściła także informację o źródłach finansowania przeprowadzonych badań (dwóch grantach), w jednym z nich mgr inż. Marta Biesiekierska jest kierownikiem (Doktorancki Grant Badawczy 2/DGB/IDUB/2022 (2022-2023) – „Analiza metabolizmu ciał ketonowych w komórkach raka szyjki macicy (HeLa) z poziomu transferazy bursztynylo-CoA:3-ketokwas-CoA (SCOT/OXCT1). Edycja genu OXCT1 z wykorzystaniem techniki

3

CRISPR/Cas9 i wynikające z tego konsekwencje dla potencjału proliferacyjnego komórek HeLa KO”)

Piśmiennictwo składa się z 200 pozycji literaturowych, przede wszystkim publikacji naukowych z renomowanych czasopism, opublikowanych w ostatnich latach, prawidłowo dobranych do poruszanej tematyki. Spis literatury został sporządzony w kolejności alfabetycznej, jest prawidłowo i jednolicie sformatowany.

Praca napisana jest ładną, poprawną polszczyzną, zgodnie z wymogami stawianymi rozprawom naukowym. Autorka w prawidłowy sposób odnosi się do wykorzystanych źródeł literaturowych. Praca jest bardzo ciekawa i starannie wykonana zarówno pod względem merytorycznym, jak i edytorskim i graficznym. Nieliczne błędy edytorskie, przejęzyczenia czy użycie skrótów myślowych lub „żargonu laboratoryjnego” (np.: „głodzenie surowicą”, „wykonywanie testu paskowego”) nie wpływa na wartość merytoryczną pracy.

Ocena merytoryczna recenzowanej rozprawy doktorskiej

Doktorantka we wstępie pracy postawiła dość kontrowersyjne pytanie, a mianowicie: czy leczenie raka dietą jest możliwe? Zgodnie z obecnym stanem wiedzy i medycyną opartą na faktach leczenie raka dietą nie może być samodzielną lub główną metodą leczenia nowotworów. Jak sama Autorka opisała, rak to skomplikowana choroba, o złożonej biochemii i fizjologii (a może bardziej adekwatne byłoby użycie terminu patofizjologii?), która wymaga specjalistycznego podejścia do leczenia, takiego jak chemioterapia, radioterapia, chirurgia, immunoterapia lub terapie biologiczne ukierunkowane na konkretny rodzaj raka, z uwzględnieniem podłoża genetycznego nowotworów i stosowania terapii spersonalizowanej.

Wstęp dobrze opisuje, w oparciu o wiarygodne źródła literaturowe, podstawy biochemiczne i genetyczne potencjalnego mechanizmu działania antynowotworowego ketozy. Wiadomo, że metabolizm komórek nowotworowych charakteryzuje się wzmożonym wychwytem i wykorzystaniem glukozy w celu promowania ich proliferacji. W odróżnieniu od komórek prawidłowych, opierających się na mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej, komórki nowotworowe do generowania energii wykorzystują głównie przekształcenie pirogronianu, przy udziale cytoplazmatycznej dehydrogenazy mleczanowej, do mleczanu. Zjawisko to, nazywane jest efektem Warburga. Tu chciałabym wejść w pewną polemikę z Panią Magister, a mianowicie w pracy stosowane są terminy „glikoliza tlenowa” i „glikoliza beztlenowa”. Moim zdaniem, termin "glikoliza tlenowa" jest mylący, stanowi pewną kalkę przyjętą z języka angielskiego i raczej nie powinien być używany w opracowaniach naukowych z zakresu biochemii. Glikoliza, to ciąg reakcji biochemicznych, podczas których jedna cząsteczka glukozy zostaje przekształcona w dwie cząsteczki pirogronianu a w tym szlaku reakcji na żadnym etapie nie jest wykorzystywany tlen. Produkt glikolizy, czyli pirogronian staje się substratem dla innych 4 szlaków biochemicznych i dopiero na tym etapie jest istotne czy mamy do czynienia

z warunkami tlenowymi czy beztlenowymi. W rzeczywistości, proces glikolizy to chemicznie ten sam proces niezależnie od tego, czy zachodzi w obecności tlenu (aerobowo) czy bez niego (beztlenowo).

O dobrym przygotowaniu planu badawczego, świadczy fakt, że wybór linii komórkowej do prowadzenia analiz, nie był przypadkowy, a pracę doświadczałą Doktorantka rozpoczęła od wybrania odpowiedniej nowotworowej linii komórkowej, która charakteryzowała się wysoką ekspresją genu OXCT1. W tym celu analizie zostało poddanych 10 wybranych linii komórkowych, zróżnicowanych pod względem pochodzenia tkankowego, jak i potencjału nowotworowego, tj. agresywności, zdolności do przerzutowania. Wyniki uzyskane za pomocą techniki RT-qPCR jednoznacznie wykazały, że komórki raka szyjki macicy HeLa wyróżniają się najwyższą ekspresją genu OXCT1 i to właśnie ten model komórkowy został zastosowany w dalszych etapach badań charakteryzujących wpływ wyciszenia/nadekspresji OXCT1 na regulację metabolizmu, a także potencjału nowotworowego tych komórek. Autorka sugeruje także, że bialleliczne wyciszenie genu OXCT1 w komórkach HeLa zdaje się zwiększać oporność komórek na klasyczne chemioterapeutyki stosowane w terapii raka szyjki macicy (doksorubicynę, cisplatynę). Natomiast nadekspresja genu OXCT1 w komórkach HeLa działa odwrotnie i powoduje zwiększenie wrażliwości komórek na działanie tych leków przeciwnowotworowych. Komórki raka szyjki macicy HeLa z wyciszoną monoallelicznie i biallelicznie ekspresją genu OXCT1 oraz nadekspresją genu OXCT1 wykorzystano także do oceny wpływu podwyższonego stężenia ciał ketonowych (β -hydroksymaślanu i acetoctanu) na proliferację komórek nowotworowych oraz oceniono wpływ zmiennych warunków glikemicznych z dodatkiem ciał ketonowych na proliferację niemodyfikowanych komórek HeLa. Próba przestawienia niemodyfikowanych komórek HeLa na wykorzystywanie ciał ketonowych jako źródła energii w warunkach obniżonego dostępu glukozy lub całkowitej deprivacji glukozy nie zakończyła się powodzeniem, choć odnotowana została zdolność wysokich stężeń acetoctanu do krótkoterminowej stymulacji proliferacji komórek HeLa. Jednak w interpretacji tej części badań należy uwzględnić fakt, że w warunkach hodowli *in vitro* nie jesteśmy w stanie uwzględnić wszystkich fizjologicznych aspektów ketozy (regulacja produkcji ciał ketonowych w wątrobie, wpływ hormonów) mogących mieć wpływ na wystąpienie „przestawienia metabolicznego”.

Dyskusja i wnioski stanowią przede wszystkim ostrożną próbę kompleksowej oceny i omówienia otrzymanych wyników badań. Szeroki wachlarz zastosowanych technik badawczych pozwolił otrzymać liczne wyniki, które czasami było trudno jednoznacznie ocenić, jednak Doktorantka dobrze poradziła sobie w takich przypadkach z ich interpretacją.

Doktorantka wykazała, że Gen OXCT1 może stanowić potencjalne narzędzie do rozwoju nowych metod terapeutycznych mających zastosowanie w leczeniu raka szyjki macicy. Z badań wynika, że nadekspresja genu OXCT1 wpływa stymulująco na proliferację, a także zdolności migracyjne i inwazyjne komórek HeLa, co sugeruje, że gen ten może być

zaangażowany w szlaki sygnałowe kontrolujące podziały komórkowe i/lub może działać jako metaboliczny promotor guza. Z kolei nadekspresja genu OXCT1 zmieniła ekspresję genów i kodowanych przez nie białek, które są zaangażowane w przejście epitelialno-mezenchymalne. Zastosowanie zarówno obniżonej zawartości jak i całkowita deprywacja glukozy w hodowli komórek HeLa hamuje ich proliferację. Nie zmienia tego faktu suplementacja ciałami ketonowymi, co raczej sugeruje upośledzoną zdolność komórek nowotworowych do wykorzystywania ciał ketonowych jako głównego źródła energii.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Reasumując, uważam, że recenzowana rozprawa doktorska zrealizowana i napisana przez mgr inż. Martę Biesiekierskiej, pt: „Analiza możliwości wykorzystania ciał ketonowych i transferazy bursztynylo-CoA:3-ketokwas-CoA jako potencjalnych narzędzi w terapii raka szyjki macicy w warunkach in vitro” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 187.1, punkt 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Zgodnie z zapisem przywołanego aktu prawnego oceniana dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz prezentuje ogólną wiedzę Kandydatki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z tym wnoszę do wysokiej Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr inż. Marty Biesiekierskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Chemii Bionieorganicznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

dr hab. n. med. Joanna Sikora
profesor uczelni