

Formularz recenzji rozprawy doktorskiej

Rada Naukowa Instytutu Fizyki im. Augusta Chetkowskiego

Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

Imię i nazwisko kandydata: mgr Patryk Rurka

Tytuł rozprawy doktorskiej: NEW INSIGHTS INTO MULTIFACETED TARGETED THERAPY FOR TREATMENT OF GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Promotor: dr hab. Anna Mrozek-Wilczkiewicz, prof. UŚ

Promotor pomocniczy: dr Katarzyna Malarz, prof. UŚ

Recenzentka: dr hab. Martyna Krzykawska-Serda

1. Tematyka rozprawy

Rozprawa ma formę spójnego tematycznie cyklu trzech opublikowanych artykułów poświęconych poszukiwaniu wielokierunkowych strategii leczenia glejaka wielopostaciowego (GBM) z wykorzystaniem pochodnych styrylochinazoliny i styrylochinazonu. Osią pracy jest ilościowa analiza zależności między strukturą związków, ich aktywnością biologiczną oraz trzema grupami podatności komórek GBM: zaburzeniem homeostazy redoks i gospodarki żelazem, dynamiką mikrotubul oraz sygnalizacją EGFR/IGF1R/InsR-PI3K/Akt/mTOR, także w warunkach podwyższonego stężenia glukozy. Zagadnienie jest aktualne ze względu na wysoką heterogenność GBM, nawrotowość choroby oraz ograniczoną skuteczność standardowego leczenia. Tematyka mieści się na pograniczu biofizyki molekularnej, fizyki układów biologicznych, chemii medycznej i biologii nowotworów. Połączenie metod spektroskopowych, mikroskopowych, cytometrycznych, biochemicznych i modeli *in vivo* pozwala badać mechanizmy oddziaływania małych cząsteczek z układami komórkowymi. Uważam zatem, że rozprawa dotyczy problemu ważnego poznawczo i potencjalnie użytecznego dla rozwoju nauk fizycznych w ich interdyscyplinarnym, biomedycznym nurcie.

2. Wiedza kandydata

Kandydat wykazał dobrą i rozległą wiedzę o klasyfikacji molekularnej GBM, jego heterogenności przestrzennej i metabolicznej, ograniczeniach terapii standardowej oraz roli bariery krew-mózg. Trafnie osadził badania w kontekście sygnalizacji EGFR/IGF1R/InsR-PI3K/Akt/mTOR, dynamiki mikrotubul i biologii redoks, a także przedstawił racjonalne przesłanki wyboru rdzenia chinazolinowego. Wstęp jest szeroki, aktualny i zasadniczo dobrze powiązany z celami cyklu. Dobór oraz łączenie metod potwierdzają znajomość relacji między właściwościami fizykochemicznymi związku, oddziaływaniami molekularnymi i odpowiedzią komórkową.

Niektóre sformułowania wymagają jednak większej precyzji mechanistycznej. Podwyższone stężenie ROS nie jest tożsame ze stresem oksydacyjnym, a hipoksja nie stanowi jego prostej, jednokierunkowej przyczyny: jest następstwem zaburzonej perfuzji, może nasilać ROS (RFT, reaktywne formy tlenu) szczególnie podczas reoksygenacji, ale uruchamia też zależne od HIF i NRF2 mechanizmy adaptacyjne. HIF-1 α nie jest swoistym markerem ROS i może być stabilizowany przez chelatację żelaza (A. Kumar et. al. (2021) *HIF1 α stabilization in hypoxia is not oxidant-initiated* eLife 10:e72873, DOI: 10.7554/eLife.72873; Siegert I. et al. (2015). *Ferritin-mediated iron sequestration stabilizes hypoxia-inducible factor-1 α upon LPS activation in the presence of ample oxygen* Cell Reports, 13, 2048–2055, DOI: 10.1016/j.celrep.2015.11.005). Opisane wyniki nie pozwalają, moim zdaniem, rozsądzić, czy wzrost HIF-1 α poprzedzał wzrost ROS, był jego następstwem, czy zachodził równolegle. Również pojęcia „antyproliferacyjny”, „autofagiczna śmierć” i „kliniczna relewancja” bywają użyte szerzej, niż pozwalają na to zastosowane testy. W części rozprawy „Wyniki i dyskusja” przydałoby się więcej odniesień do literatury oraz wyraźniejsze rozdzielanie obserwacji, interpretacji i hipotez. Są to uwagi dotyczące rygoru interpretacyjnego; nie podważają pozytywnej oceny ogólnej wiedzy teoretycznej Kandydata.

3. Samodzielność kandydata

Udokumentowany zakres wkładu Kandydata wskazuje na stopniowy wzrost jego samodzielności naukowej oraz znaczną biegłość eksperymentalną. W pierwszej publikacji cyklu, w której występuje jako trzeci autor, odpowiadał za analizę poziomu białek szlaku EGFR-mTOR metodą Western blot oraz za oznaczenia wykonane metodą Lumit Immunoassay. W dwóch kolejnych publikacjach Kandydat jest pierwszym autorem. W pracy poświęconej sulfonowanym pochodnym styrylochinazoliny przeprowadził badania cytotoksyczności, analizę cyklu komórkowego i apoptozy metodą cytometrii przepływowej oraz oznaczenia poziomu ekspresji białek metodami Western blot i Lumit Immunoassay. Zgodnie z deklaracją CRediT jego

wkład obejmował również formalną analizę i wizualizację wyników. W publikacji dotyczącej związku W1B wykonał pomiary metodą termoforezy mikroskalowej (MST), przeprowadził badania skuteczności terapii skojarzonej i analizy immunoblottingowe, a także przygotował pierwszą wersję manuskryptu. Zakres wkładu przedstawiony w oświadczeniach Kandydata jest zasadniczo spójny z sekcjami dotyczącymi udziału autorów zamieszczonymi w poszczególnych publikacjach i nie wskazuje na istotne rozbieżności w przypisaniu zasadniczych zadań badawczych, chociaż poszczególne źródła różnią się poziomem szczegółowości i sposobem określenia ról.

Projekt miał charakter zespołowy: synteza związków, modelowanie, badania przepuszczalności i doświadczenia na danio pręgowanym były prowadzone przez wyspecjalizowanych współpracowników, natomiast koncepcję i projekt części badań współtworzyły promotorki. Jest to właściwe dla interdyscyplinarnej pracy, a zakres własnych zadań Kandydata został przejrzysto wyodrębniony. Dwie publikacje pierwszoautorские, integracja wyników w spójną rozprawę, udział w zgłoszeniu patentowym oraz liczne wystąpienia konferencyjne potwierdzają umiejętność planowania, prowadzenia, analizowania i komunikowania badań. Rozprawa wykazuje wymaganą ustawowo umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

4. Oryginalność rozprawy

Oryginalność osiągnięcia polega na doświadczalnym porównaniu trzech uzupełniających się strategii opartych na spokrewnionych rusztowaniach chemicznych. Dla związku IS20 wykazano zależność między kompleksowaniem metali, wzrostem sygnału ROS, zmianami odpowiedzi antyoksydacyjnej i aktywnością przeciwnowotworową, z uwzględnieniem NDRG1. Dla związku TS5 potoczono jego wpływ na polimeryzację i organizację mikrotubul z modulacją szlaku EGFR/mTOR oraz aktywnością w modelu danio pręgowanego. Dla związku W1B zidentyfikowano inhibicję osi IGF1R/InsR i zależne od stężenia glukozy obejście przez EGFR, a następnie racjonalnie zastosowano skojarzenie z dakomitynibem. Wyniki wnoszą wartościową wiedzę o tym, jak kontekst metaboliczny i sieciowy może wpływać na skuteczność inhibitorów w GBM.

Spójność cyklu ma przede wszystkim charakter koncepcyjny: poszczególne pochodne oddziałują na odmienne, lecz komplementarne podatności komórki nowotworowej. Nie wykazano natomiast, aby jeden związek realizował równocześnie wszystkie trzy filary mechanizmu. Z tego względu określenia sugerujące pełne „wyjaśnienie” mechanizmu, „walidację” terapii wielocelowanej czy gotowość translacyjną powinny zostać zastąpione ostrożniejszym wnioskiem o dostarczeniu silnych danych przedklinicznych i hipotez mechanistycznych. Najmocniejsze są obserwacje oparte na kilku zgodnych metodach; słabsze pozostają twierdzenia dotyczące peroksydacji lipidów i przekraczania bariery krew–mózg. Mimo tych ograniczeń cykl stanowi oryginalne i wartościowe rozwiązanie problemu naukowego, a jego wyniki uzasadniają dalszy rozwój badanych cząsteczek.

5. Pytania i uwagi krytyczne, na które Recenzentka oczekuje odpowiedzi Kandydata w czasie obrony

Poniższe pytania nie podważają wartości rozprawy. Służą rozdzieleniu danych bezpośrednich od wniosków pośrednich oraz doprecyzowaniu granic interpretacji podczas publicznej obrony.

- A. **Relacja hipoksja–ROS i znaczenie HIF-1 α .** Proszę rozdzielić pojęcia podwyższonego poziomu ROS, stresu oksydacyjnego i zaburzonej homeostazy redoks. Co w GBM jest przyczyną, a co skutkiem w relacji między wzrostem guza, zaburzoną perfuzją, hipoksją i ROS? Jak zmienia się ta relacja w hipoksji przewlekłej oraz cyklicznej z reoksygenacją? W jaki sposób interpretować wzrost HIF-1 α po traktowaniu związkiem IS20, skoro białko to może być stabilizowane zarówno przez hipoksję i ROS, jak i przez zahamowanie zależnych od Fe(II) hydroksylaz prolinowych?
- B. **Mechanizm działania IS20.** Które wyniki bezpośrednio potwierdzają wewnątrzkomórkową chelatację żelaza, uszkodzenie mitochondriów oraz peroksydację lipidów, a które jedynie pozostają z nimi zgodne? Spektrofotometryczne kompleksowanie kationów Fe³⁺/Cu²⁺ w DMSO, sygnał CellROX, stężenie GSH, ekspresja wybranych genów/białek i częściowe osłabienie efektu przez kwas askorbinowy wspierają udział procesów redoks, ale nie mierzą bezpośrednio puli labilnego żelaza, oddychania mitochondrialnego ani utlenionych lipidów. Jakie doświadczenia rozstrzygające zaproponowałby Kandydat?

- C. **Znaczenie wyników testu MTS.** Test MTS mierzy aktywność redukcyjną komórek, a nie bezpośrednio ich liczbę, proliferację ani mechanizm śmierci; jest też zależny od metabolizmu i czasu podwojenia. Jak Kandydat uzasadnia porównywanie wartości IC_{50} po 72 godzinach między liniami różniącymi się tempem wzrostu i profilem metabolicznym oraz między warunkami prawidłowej i wysokiej glukozy? Które wyniki należałoby potwierdzić przez bezpośrednie liczenie komórek, EdU/BrdU, test klonogeny, oznaczenie ATP?
- D. **Zakres pojęcia terapii wielokierunkowej.** Badania TS5 obejmują prawidłowo dobraną referencję w postaci paklitakselu i bezpośredni test polimeryzacji tubuliny. Czy zmiany sygnalizacji EGFR/mTOR są następstwem zaburzenia mikrotubul, czy niezależnym działaniem równoległym? Jakie doświadczenie pozwoliłoby rozstrzygnąć o kierunku przyczynowym? Proszę też wyjaśnić, czy tytułowe „multifaceted targeted therapy” oznacza wielocelowe działanie pojedynczej cząsteczki, czy racjonalną terapię skojarzoną, skoro żaden z trzech związków nie został przebadany jednocześnie względem wszystkich trzech mechanizmów działania związków stanowiących filary rozprawy.
- E. **Normalizacja, powtarzalność i założenia statystyczne.** Jak sprawdzono stabilność białek referencyjnych, takich jak GAPDH, β -aktyna i winkulina, w warunkach stresu oksydacyjnego, zaburzeń cytoszkieletu oraz zmienionego stężenia glukozy? β -aktyna nie jest automatycznie niewłaściwa dla związku oddziałującego na mikrotubule, lecz każdy standard wymaga walidacji w danych warunkach. Czy zastosowanie „całkowitego białka” lub więcej niż jednego niezależnego standardu zmieniałoby pewność wniosków? Proszę również omówić kontrolę założeń testów parametrycznych przy małych liczebnościach prób oraz obecność dopasowanych kontroli rozpuszczalnika, zwłaszcza w pomiarach ROS z użyciem DMSO (Tunçer, S. *et al.* Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes. *Sci Rep* 8, 14828 (2018), DOI: 10.1038/s41598-018-33234-z)
- F. **Synergia W1B z dakomitynibem.** Indeks kombinacji został obliczony i wyniósł 0,94 w LN229 oraz 0,87 w LN229 HG, co wskazuje odpowiednio na efekt bliski addytywności i niewielką synergii. Jak stabilne są te wnioski w całej macierzy dawek i przy różnych proporcjach związków? Czy obliczano przedziały niepewności i czy wynik potwierdzono niezależną metodą, np. modelem Bliss? Jak odróżnić farmakodynamiczną synergii blokady IGF1R/InsR i EGFR od zależnej od testu MTS zmiany metabolizmu w wysokiej glukozie?
- G. **Zakres wniosków przedklinicznych i kolejny etap walidacji.** Rozprawa opiera się głównie na liniach 2D i modelu danio pręgowanego, natomiast przenikanie przez barierę krew–mózg oceniano metodami *in silico* i biomimetycznymi. Dla związku W1B przewidywany logBB wskazuje na ograniczoną penetrację nieuszkodzonej bariery. Jakie badanie Kandydat uznaje za najważniejszy następny krok: komórki macierzyste GBM i organoidy pochodzenia klinicznego, model BBB z pomiarem transportu i effluxu, farmakokinetkę mózgową czy ortotopowy model guza? Proszę również odnieść się do stwierdzenia o badaniach na modelu PDX: klasyczne PDX w myszach z niedoborem odporności zachowują część heterogenności guza, lecz nie odtwarzają w pełni ludzkiego komponentu immunologicznego - czy jest to zatem dobry model dla dalszych badań?

6. Ocena końcowa

Rozprawa jest logicznie zorganizowana i pozostaje spójna z trzema załączonymi publikacjami pod względem celów, materiału badawczego, metod i zasadniczych wyników. Jej wspólnym mianownikiem jest wykorzystanie pochodnych chinazolinowych do badania komplementarnych podatności GBM. Oświadczenia autorskie pozwalają jednoznacznie zidentyfikować wkład Kandydata, a ich treść odpowiada informacjom zawartym w artykułach. Rozprawa prezentuje wymaganą wiedzę teoretyczną, umiejętność samodzielnego prowadzenia badań i oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Najważniejsze zastrzeżenia dotyczą nie jakości uzyskanych danych, lecz siły części wniosków: w kilku miejscach obserwacje korelacyjne lub pośrednie przedstawiono jako pełny mechanizm przyczynowy, a znaczenie przedkliniczne jako bliskie zastosowaniu klinicznemu. Odpowiednie doprecyzowanie tych granic podczas obrony będzie świadczyć o dojrzałości naukowej Kandydata. Wysoko oceniam interdyscyplinarność badań, zastosowanie wielu wzajemnie uzupełniających się metod oraz zdolność do połączenia biologii redoks, cytoszkieletu i sygnalizacji receptorowej w jeden program badawczy. Całościowa ocena rozprawy jest jednoznacznie pozytywna.

Wnoszę o dopuszczenie mgr Patryka Rurki do dalszych etapów postępowania, a ze względu na oryginalność cyklu i bardzo dobry dorobek publikacyjny — również o wyróżnienie rozprawy.

Ja, niżej podpisana, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr. Patryka Rurki spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.). Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Fizyki im. Augusta Chełkowskiego Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie mgr Patryka Rurki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk fizycznych.

Rozprawa spełnia wymagania ustawowe: TAK

Wniosek o wyróżnienie rozprawy: TAK

.....

data sporządzenia recenzji

.....

podpis Recenzentki