

Formularz recenzji rozprawy doktorskiej

Rada Naukowa Instytutu Fizyki im. Augusta Chełkowskiego

Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

Imię i nazwisko kandydata: Patryk Ziola

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Chelatory żelaza jako inhibitory kinaz tyrozynowych – nowa strategia leczenia glejaka wielopostaciowego”

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

Promotor pomocniczy: dr Katarzyna Malarz, prof. UŚ

Recenzentka: dr hab. Martyna Krzykawska-Serda

1. Tematyka rozprawy

czy tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy zagadnień istotnych dla rozwoju dyscypliny (sugerowane ok. 50–150 słów):

Rozprawa podejmuje aktualny i ważny problem poszukiwania nowych strategii leczenia glejaka wielopostaciowego poprzez projektowanie związków o potencjalnie wielokierunkowym mechanizmie działania: zdolności do oddziaływania z jonami żelaza, zaburzenia równowagi redoks oraz hamowania receptorowych kinaz tyrozynowych. Autor zestawia wyniki uzyskane dla trzech grup pochodnych – tiosemikarbazonów, styrylochinazolin i styrylochinolin – oraz analizuje ich aktywność w modelach dwu- i trójwymiarowych, a wybrane efekty także w modelu *in vivo* (*Danio rerio*). Badania łączą metody hodowli komórkowej z pomiarami spektroskopowymi i luminescencyjnymi, cytometrią przepływową, analizą ekspresji genów i białek, testami aktywności kinaz oraz mikroskalową termoforezą. Taka interdyscyplinarna konstrukcja wpisuje się w dyscyplinę nauki fizyczne, zwłaszcza w obszar badań oddziaływań molekularnych i ilościowych metod biofizycznych, a zarazem ma istotny wymiar biomedyczny. Tematyka rozprawy jest zatem ważna zarówno poznawczo, jak i aplikacyjnie, choć droga od aktywności w modelu eksperymentalnym do użyteczności klinicznej wymaga dalszej walidacji.

2. Wiedza kandydata

ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki fizyczne (sugerowane ok. 50–250 słów):

Rozprawa potwierdza, że Kandydat posiada rozległą wiedzę na styku biologii nowotworów, chemii związków koordynacyjnych i biofizyki oddziaływań ligand–białko. Swobodnie porusza się w zagadnieniach dotyczących metabolizmu żelaza, stresu oksydacyjnego, sygnalizacji receptorowych kinaz tyrozynowych, apoptozy i mechanizmów śmierci komórkowej, a także w metodyce badań komórkowych i molekularnych. Mocną stroną pracy jest umiejętność połączenia tych obszarów w spójną hipotezę badawczą oraz interpretowania wyników na kilku poziomach organizacji biologicznej. Jednocześnie syntetyczny charakter autoreferatu sprawia, że część uogólnień wymaga większej precyzji. Dotyczy to zwłaszcza rozróżnienia między odwracalnym wiązaniem tlenu a utlenieniem żelaza hemowego, operacyjnego znaczenia IC_{50} wyznaczanego testem MTS, użycia pojęcia „homeostazy” w kontekście komórek nowotworowych oraz zakresu wniosków dotyczących selektywności i mechanizmu działania. Wprowadzenie i dyskusja mogłyby szerzej odwoływać się do aktualnego piśmiennictwa spoza bezpośredniego kręgu badawczego Autorów oraz wyraźniej oddzielać wynik eksperymentalny od interpretacji i hipotezy mechanistycznej. Uwagi te nie podważają pozytywnej oceny ogólnej wiedzy teoretycznej Kandydata, lecz wskazują zagadnienia warte pogłębienia podczas obrony publicznej.

3. Samodzielność kandydata

ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora (sugerowane ok. 50–250 słów):

Na podstawie rozprawy, oświadczeń współautorów oraz pozycji Kandydata w cyklu publikacyjnym wysoko oceniam Jego samodzielność naukową. Jest pierwszym autorem dwóch z trzech prac wchodzących w skład osiągnięcia, a w trzeciej publikacji wniósł istotny wkład eksperymentalny. Zrealizował rozbudowany program badań biologicznych i biofizycznych obejmujący liczne linie komórkowe, hodowle 2D i 3D, analizę aktywności metabolicznej i luminescencyjnej, cytometrię przepływową, badania ekspresji mRNA i białek, oznaczenia reaktywnych form tlenu, ocenę chelatowania żelaza oraz interpretację testów aktywności kinaz i mikroskalowej termoforezy. Uczestniczył również w analizie danych i przygotowaniu publikacji. Zakres ten świadczy o bardzo

dobrym opanowaniu warsztatu oraz o umiejętności planowania kolejnych etapów eksperymentu. Współpraca ze specjalistami odpowiedzialnymi za syntezę związków, modelowanie molekularne i badania *in vivo* jest adekwatna do interdyscyplinarnego charakteru projektu i pokazuje zdolność do efektywnego działania w dużym zespole. Pewien niedosyt pozostawia krótka, miejscami bardziej opisowa niż krytyczna dyskusja wyników w autoreferacie. Nie zmienia to jednak mojej jednoznacznie pozytywnej oceny zdolności Kandydata do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

4. Oryginalność rozprawy

ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego lub oryginalne zastosowanie wyników własnych badań (sugerowane ok. 100–250 słów):

Oryginalność rozprawy wynika przede wszystkim z konsekwentnego rozwinięcia koncepcji związków wielofunkcyjnych, które mogą jednocześnie oddziaływać na homeostazę żelaza oraz wybrane elementy sygnalizacji kinaz tyrozynowych. Kandydat porównał trzy klasy pochodnych chemicznych, wskazał związki wiodące oraz zestawiał dane o ich aktywności w różnych modelach komórkowych z wynikami analiz molekularnych, biochemicznych i biofizycznych. Szczególnie wartościowe jest poszukiwanie związku pomiędzy strukturą chemiczną, wiązaniem jonów metalu, aktywnością wobec kinaz i odpowiedzią komórkową. Przedstawiony cykl dostarcza nowych danych dotyczących badanych pochodnych i proponuje interesującą strategię ich dalszego rozwoju jako kandydatów do zastosowania przeciwnowotworowego. Oryginalny charakter ma również wielopoziomowy schemat oceny – od badań przesiewowych, przez modele 3D, po wybrane testy mechanistyczne i *in vivo*. Należy jednak zachować ostrożność w przypisywaniu poszczególnym mechanizmom bezpośredniej roli przyczynowej: dla części grup związków dowód bezpośredniego chelatowania, komórkowego zaangażowania celu i selektywności kinazowej pozostaje niepełny. Ograniczenia te wyznaczają naturalny kierunek dalszych badań i nie odbierają przedstawionemu rozwiązaniu wartości oryginalnego problemu naukowego.

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

Poniższe pytania mają na celu doprecyzowanie interpretacji wyników i wskazanie ograniczeń, które – odpowiednio omówione – mogą wzmocnić wartość przedstawionego osiągnięcia.

1. **Znaczenie IC₅₀ w teście MTS.** W rozprawie IC₅₀ jest miejscami opisywane jako stężenie hamujące proliferację, a w szerszej interpretacji niemal jako dawka letalna. Tymczasem sygnał MTS odzwierciedla zdolność metabolicznie aktywnych komórek do redukcji tetrazolium, zależną m.in. od NAD(P)H, i nie jest bezpośrednim pomiarem liczby podziałów ani śmierci komórkowej (Dunigan i wsp., 1995, *BioTechniques* 19:640–649). Proszę podać operacyjną definicję raportowanego IC₅₀, zastosowane ograniczenia modelu oraz – jeśli były wyznaczane – przedziały ufności. Jak wykluczono bezpośredni wpływ związków na metabolizm lub redukcję odczynnika? Jakim pomiarem ortogonalnym można byłoby potwierdzić liczbę żywych komórek i rzeczywiste hamowanie proliferacji?
2. **Czas ekspozycji i tempo proliferacji.** Wszystkie linie eksponowano przez 72 godziny, mimo że różnią się czasem podwojenia i dynamiką osiągania konfluencji. Proszę uzasadnić wybór jednego punktu czasowego, podać znane lub zmierzone czasy podwojenia oraz omówić, w jakim stopniu różna liczba przeżytych podziałów mogła wpływać na wartości IC₅₀.
3. **Leki referencyjne i wartość modelu przesiewowego.** Erlotynib i ozymertynib wykazywały w zastosowanym układzie umiarkowaną lub niewielką aktywność, choć są lekami skutecznymi w ściśle określonych, molekularnie wyselekcjonowanych nowotworach z aktywacją EGFR. Nie stanowią natomiast uniwersalnych dodatnich kontroli cytotoksyczności w glejaku; erlotynib nie poprawił wyników leczenia nawrotowego glejaka w randomizowanym badaniu II fazy (van den Bent i wsp., 2009, *Journal of Clinical Oncology* 27:1268–1274), a aktywność ozymertynibu zależy od kontekstu molekularnego. Proszę uzasadnić wybór tych kontroli, scharakteryzować status EGFR badanych linii i odnieść się do kategorycznego stwierdzenia, że związek nieaktywny w takim teście nie może stanowić podstawy skutecznego leczenia. Słabszy wynik leku referencyjnego nie unieważnia badań *in vitro*, lecz ujawnia ograniczenia biologiczne i predykcyjne konkretnego modelu.

4. **Plan analizy statystycznej.** Opis statystyki w autoreferacie jest zbyt ogólny, a między tekstem rozprawy i publikacjami występują różnice: wskazano test Tukeya, podczas gdy w pracach składowych stosowano również testy Dunnetta i korekcję Bonferroniego. Proszę przyporządkować konkretny test do każdego typu wyniku, wyjaśnić, co stanowiło jednostkę analizy, oraz odróżnić powtórzenia biologiczne od technicznych. Czy oceniano rozkład reszt i jednorodność wariancji, jak postępowano przy niespełnieniu założeń oraz jak kontrolowano wielokrotność porównań? Przy $n=3$ formalny test normalności ma niewielką moc, dlatego istotniejsze jest uzasadnienie modelu, diagnostyka reszt, prezentacja punktów danych i wielkości efektu wraz z niepewnością.
5. **Korekcja tła i walidacja pomiarów optycznych.** W przedstawionej rozprawie oraz publikacjach nie znalazłam informacji na temat odejmowania tła w testach MTS, CellTiter-Glo, CellROX i UV-Vis, zastosowanie ślepych prób z podłożem, rozpuszczalnikiem, badanym związkiem i jonami metalu bez komórek oraz sprawdzenie interferencji barwnej, autofluorescencji, bezpośredniej redukcji odczynnika i efektu filtra wewnętrznego. Jak określono zakres liniowy i czułość pomiarów, jakie stosowano kontrole dodatnie i negatywne? Proszę także rozróżnić jakościową dokumentację obrazową od ilościowego sygnału odczytywanego w czytniku płytek.
6. **Geny i białka referencyjne.** W autoreferacie dla RT-qPCR wskazano GAPDH, natomiast w publikacji P1 – HPRT1. Proszę wyjaśnić tę rozbieżność i uzasadnić stabilność genów referencyjnych w warunkach chelatowania żelaza i stresu oksydacyjnego. Analogicznie proszę uzasadnić wybór białek normalizujących w Western blot, przedstawić sposób kontroli liniowości densytometrii i zakresu detekcji.
7. **Apoptoza i ferroptoza.** Obniżenie poziomu GPX4 i 4F2hc oraz zmiany ROS (RFT) i metabolizmu żelaza są zgodne z możliwością udziału ferroptozy, ale nie stanowią jej rozstrzygającego dowodu. Jak Kandydat odróżniłby ferroptozę od apoptozy i innych form śmierci?
8. **Strategia zwiększania ROS i znaczenie „homeostazy”.** Proszę zdefiniować, co w publikacji P1 oznacza „homeostaza w komórkach nowotworowych”, i krytycznie omówić zwiększanie ROS jako strategię terapeutyczną. Jakie znaczenie mają heterogenność guza, adaptacja układów NRF2/tioredoxyna/GPX4, toksyczność wobec prawidłowych komórek, hipoksja, przenikanie przez barierę krew-mózg, farmakokinetyka oraz ogólnoustrojowe zaburzenie gospodarki żelazem?
9. **Żelazo, transport tlenu i kontekst ewolucyjny.** Proszę precyzyjnie rozróżnić odwracalne przyłączenie O_2 do hemowego żelaza od trwałego utlenienia prowadzącego do methemoglobiny, pamiętając, że opis elektronowy oksyhemoglobiny jest bardziej złożony niż prosty model wyłącznie $Fe(II)-O_2$. Warto także uporządkować kontekst ewolucyjny: w beztlenowym środowisku wczesnej Ziemi rozpuszczalne $Fe(II)$ było łatwo dostępne, natomiast wzrost zawartości tlenu sprzyjał jego utlenianiu i wytrącaniu, co wzmacniało presję na systemy pozyskiwania, chelatowania, magazynowania, detoksykacji i recyklingu żelaza. Jak ta perspektywa pomaga interpretować podatność komórek nowotworowych na zaburzenie gospodarki żelazem?

6. Ocena końcowa

Recenzowana rozprawa przedstawia spójny, oryginalny i wartościowy cykl badań poświęconych nowej strategii oddziaływania na komórki glejaka wielopostaciowego. Kandydat wykazał się szerokim warsztatem eksperymentalnym, umiejętnością pracy na styku kilku dziedzin oraz znaczącym udziałem w powstaniu publikacji stanowiących osiągnięcie. Sformułowane przeze mnie uwagi dotyczą przede wszystkim precyzji interpretacji, kompletności opisu metod ilościowych i statystycznych oraz krytycznego przedstawienia ograniczeń; stanowią materiał do inicjacji dyskusji podczas obrony i nie podważają zasadniczych walorów naukowych rozprawy.

Ja, niżej podpisana, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr. Patryka Zioly 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 Zioly 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: NIE

.....
data sporządzenia recenzji

.....
podpis Recenzentki