

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ BADR SAIF MOHSEN QASEMA
pt. „METABOLOMICS ANALYSIS OF TIME AND OXYGEN EFFECT ON
FIBROSARCOMA CELL LINE (HT1080) – MODEL STUDY”

Historia biochemii, której początki sięgają końca XIX w., zaczęła się od badań nad metabolizmem komórkowym. Wydawać by się więc mogło, że na przestrzeni ponad 100 lat został on na tyle dobrze poznany, że niewiele jest tu jeszcze do dodania i odkrycia. A tymczasem okazuje się, że ta dziedzina biochemii kryje w sobie jeszcze wiele tajemnic, których poznanie staje się możliwe dzięki nowym technikom i metodom badawczym. To dzięki nim odkrywane są nowe szlaki metaboliczne, czego przykładem jest redukcyjna karboksylacja α -ketoglutaranu do cytrynianu z udziałem glutaminy, a klasyczne enzymy metaboliczne, takie jak np. enzymy glikolityczne, okazują się być wielofunkcyjnymi białkami (*moonlighting proteins*) o niekatalitycznych aktywnościach. Takim podejściem do metabolizmu komórkowego jest metabolomika zajmująca się w sposób całościowy analizą jakościową i ilościową metabolitów w danym materiale biologicznym. Biorąc pod uwagę nowe możliwości, jakie daje ta gałąź badań, Doktorant zajął się jednym z najstarszych problemów będących przedmiotem badań nad metabolizmem, a mianowicie wpływem tlenu cząsteczkowego na przemiany, zwłaszcza energetyczne, zachodzące w komórkach, w tym komórkach nowotworowych. W swoich badaniach metabolomicznych wykorzystał on technikę spektroskopii magnetycznej rezonansu jądrowego, a konkretnie ^1H NMR do profilowania metabolitów wytwarzanych przez komórki HT 1080 ludzkiego włókniakomięsaka w odpowiedzi na stres wywołany hypoksją i hyperoksją i porównanie tych wyników z danymi uzyskanymi dla komórek hodowanych w normoksji. Stąd uważam, że podjęcie takich badań było jak najbardziej trafne i w pełni uzasadnione.

Niestety dysertacja, co muszę podkreślić już na początku mojej recenzji, została napisana fatalnym językiem angielskim, co znacznie utrudniało, a momentami wręcz uniemożliwiało zrozumienie zawartych w niej treści. Mogę mieć tylko nadzieję, że mimo tych językowych utrudnień udało mi się trafnie ocenić dokonania naukowe Doktoranta. Obok języka, dodatkowym utrudnieniem przy czytaniu tej pracy był niestandardowy układ rozdziałów. Zamiast typowego dla tego typu opracowań podziału na wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja i wnioski, mamy pracę podzieloną na trzy główne rozdziały. Rozdział pierwszy swoją zawartością odpowiada klasycznemu wstępowi, natomiast dwa kolejne rozdziały są już podzielone na mniejsze podrozdziały typowe dla tego typu opracowań. Mamy więc, coś na kształt dwóch minidysertacji, poprzedzonych dodatkowo wstępem. Konsekwencją tego są liczne powtórzenia tych samych treści, zwłaszcza dotyczących wykorzystywanych materiałów i metod oraz częściowo wyników. W ten sposób praca niepotrzebnie rozrasta się objętościowo, co powoduje, że jej przeczytanie zabiera zdecydowanie więcej czasu, a nie

przynosi korzyści w postaci jej łatwiejszego i lepszego zrozumienia. Dodatkową, niepotrzebną komplikacją jest zamieszczenie odrębnych spisów literatury po każdym z takich rozdziałów.

Jak już wspomniałem powyżej, praca rozpoczyna się rozdziałem, który w całości pełni rolę wstępu poświęconego w większości podstawowym informacjom dotyczącym biologii komórki nowotworowej i jej metabolizmowi. Biorąc pod uwagę, jaki cel miała praca i jakie wyniki otrzymano, informacje z pierwszych czterech podrozdziałów dotyczących biologii nowotworów (1.1, 1.2., 1.3., 1.4.) można było z powodzeniem pominąć, zwłaszcza, że znajdziemy tam szereg błędów merytorycznych.

Drugi rozdział pt. „*Quantitative ¹H NMR analysis of intracellular and extracellular metabolome of HT1080 cell line under hypoxia, normoxia and hyperoxia*” poświęcony jest profilom wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych metabolitów wytwarzanych przez komórki hodowane przy 1%, 6% i 21% stężeniu tlenu, co odpowiada warunkom określanych w pracy, odpowiednio, jako hypoksja, normoksja i hyperoksja. Rozdział ten rozpoczyna krótki „Wstęp”, pełniący równocześnie rolę podrozdziału „Cel pracy”, w którym odniesiono się do warunków tlenowych jakie panują w guzie nowotworowym, zwracając uwagę na różnice w stężeniach tlenu, jakie znajdujemy w tkance nowotworowej (1 – 6%), a w jakich prowadzone są zwyczajowo hodowle komórek nowotworowych *in vitro* (21%). Podrozdział „Materiały i metody” jest dowodem na to, że Doktorant w czasie realizacji swojej pracy doktorskiej, z jednej strony bardzo dobrze opanował metody wykorzystywane w pracy z hodowlami tkankowymi, z drugiej jest ekspertem w zakresie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego. Co należy docenić, jako że wymaga to zupełnie różnych umiejętności, jeżeli chodzi o warsztat badawczy. Drobne uwagi, jakie mam do tego rozdziału, dotyczą kolejności poszczególnych podrozdziałów. Nie wiem, czym kierował się Doktorant, ale bardziej logicznym byłoby zamieszczenie podrozdziału „2.5. Cell growth measurement” bezpośrednio po „2.2. Cell culturing medium (MEM) preparation”, a także zamiana kolejności w przypadku podrozdziałów „2.3. Culture medium extraction” i „2.4. Cell extraction”. I jeszcze jedna uwaga. Przy podawaniu parametrów wirowania powinniśmy używać wartości „g”. Jeżeli już chcemy posługiwać się obr./min (rpm), to powinniśmy, obok typu wirówki podać również szczegóły dotyczące stosowanego rotora i ewentualnie próbówki wirówkowej.

Przechodząc do omawiania uzyskanych przez Doktoranta wyników, należy na wstępie zaznaczyć, że tak jak w przypadku wszystkich technologii „omicznych”, ich wielość przedstawia prawdziwe wyzwanie dla Autora, co do sposobu ich pokazania i opisanie, jak i dla recenzenta, który musi odnaleźć się w ich „gąszczu”. W mojej opinii, generalnie, Doktorant wyszedł przy ich opisie obronną ręką i gdyby nie problemy językowe, to zostały one przedstawione w sposób w miarę przystępny. Natomiast nie uniknięto szeregu drobnych błędów, polegających głównie na niezgodności informacji pomiędzy tekstem a rycinami (patrz poniżej). Czego nie zrobiono, a co można by było, dla

jasności przekazu, poprawić komentuję poniżej. Natomiast, jeżeli chodzi o recenzenta, to tak szczegółowe omówienie wyników (patrz poniżej) było konieczne, dla stworzenia sobie pełnego ich obrazu i wyrobienia sobie poglądu, co do ich wartości i rzetelności.

Podrozdział „Wyniki” podzielono na trzy części. Zaczyna się od pokazania krzywych wzrostu komórek HT1080 hodowanych w warunkach analogicznych do hodowli komórkowych, które wykorzystywano do badań metabonomicznych. Drugi z podrozdziałów poświęcono analizie wewnątrzkomórkowych metabolitów wytwarzanych przez komórki H1080 w warunkach hipoksji, normoksji i hyperoksji prowadzono po 12, 24 i 36 godzinach hodowli. Jak rozumiem, celem tych badań było sprawdzenie, jak zmienia się profil wytwarzanych metabolitów, a więc metabolizm komórkowy, przy przedłużającym się stresie wywołanym hipoksją i hyperoksją, w porównaniu z warunkami hodowli określonymi jako normoksja. Kiedy hodowlę komórek prowadzono przy 1%-owym stężeniu tlenu (hipoksja), względne ilości wszystkich 17 metabolitów istotnie spadały w czasie. Te związki to aminokwasy: glicyna, walina, fenyloalanina, glutamina, treonina, tyrozyna, alanina, asparaginan i leucyna i metabolity będące wynikiem ich przemian takie jak kreatyna i kreatynina, intermedyaty przemiany puryn: IMP i hipoksantyna, intermedyaty przemiany cukrowej: mleczan i UDP-GlcNAc oraz intermedyaty przemiany lipidowej: cholina i O-fosfocholina. W przypadku większości metabolitów obserwuje się stopniowy ich spadek wraz z wydłużającym się czasem hodowli, ale mamy i takie związki, przykładem tego jest kreatynina, której ilość znacząco spada dopiero po 24 godzinach hodowli, oraz hipoksantyna, której wyraźny spadek, ale bez dalszych zmian, również obserwuje się po 24 godzinach. **W tym miejscu nasuwa mi się uwaga dotycząca również i pozostałych prezentowanych w pracy wyników. Dlaczego od razu, dla ułatwienia czytelnikowi poruszania się w „gąszczu” uzyskanych danych, nie pogrupowano odpowiednio zidentyfikowanych metabolitów, podając równocześnie podstawowe informacje dotyczące ich umiejscowienia w metabolizmie, tak jak to starałem się zrobić powyżej. Kolejna uwaga, tym razem szczegółowa, dotyczy braku wyników na rycinie 5 dotyczących asparagianu i alaniny wymienionych w tekście jako metabolity, którego ilości spadają wraz z czasem hodowli.**

W warunkach normoksji, kiedy hodowlę komórek prowadzono przy 6%-owym stężeniu tlenu, liczba metabolitów, których względne ilości w sposób wyraźny spadały w czasie, ulegała zmniejszeniu. W tych warunkach zidentyfikowano 10 takich związków. Tak jak w przypadku hipoksji były to następujące aminokwasy: glutamina, glutaminian, treonina, asparaginan i N-acetyloasparaginan. Inne metabolity, zidentyfikowane również w warunkach hipoksji to mleczan, UDP-N-GlcNAc oraz O-fosfocholina. Natomiast, w warunkach normoksji stwierdzono jeszcze spadek w ilości octanu oraz bursztynianu, łączonego głównie z cyklem kwasów trójkarboksylowych. Podobnie jak w przypadku hipoksji, dla większości metabolitów obserwuje się stopniowy spadek w ich względnych ilościach wraz

z wydłużającym się czasem hodowli, ale dla octanu, treoniny i mleczanu wyraźny spadek stwierdza się tylko pomiędzy 12 a 24 godziną hodowli.

Z kolei, w warunkach hyperoksji, a więc kiedy komórki hodowano przy 21%-owym stężeniu tlenu, znowu liczba metabolitów, których poziomy w znaczący sposób zmieniały się wraz z czasem, wzrastała do 16. Przy czym w tych warunkach obserwowano zarówno spadki jak i wzrosty we względnych ilościach zidentyfikowanych związków, reprezentowanych również głównie przez aminokwasy. I tak, obserwowano spadki w ilościach glutaminianu, glutaminy i asparagianu, natomiast wzrosty dla tyrozyny, histydyny, izoleucyny, waliny, leucyny, fenyloalaniny, glicyny i asparaginy. Inne metabolity, których ilości spadały wraz z czasem hodowli, to jak w przypadku hipoksji i normoksji UDP-N-GlcNAc i O-fosfocholina oraz fumaran będący intermediatem cyklu Krebsa. Natomiast stwierdzono wzrosty w poziomach mrowczanu. W hyperoksji, znaczący wzrost w poziomach większości aminokwasów stwierdza się dopiero po 36 godzinach hodowli.

Podsumowując należy stwierdzić, że zaledwie kilka wspólnych metabolitów, których ilości zmieniają się wraz z czasem hodowli, zidentyfikowano dla komórek hodowanych przy trzech różnych stężeniach tlenu. Zwraca również uwagę fakt, że wyraźnie mniejszą liczbę metabolitów, których ilości zmieniają się wraz z czasem hodowli, zidentyfikowano w przypadku normoksji, niż w przypadku przedłużającego się stresu związanego z hipoksją lub normoksją. Wyników prezentowane w tym rozdziale podsumowuje Tabela 3 ze strony 62, do której mam analogiczną uwagę co powyżej. **A mianowicie, należało odpowiednio pogrupować zidentyfikowane metabolity, podając równocześnie podstawowe informacje dotyczące ich umiejscowienia w metabolizmie. Na przykład, aminokwasy zamieścić jeden za drugim, a zaraz za nimi inne metabolity będące intermediatami ich przemian. Ta uwaga dotyczy oczywiście i pozostałych tabel prezentujących podobne wyniki. Co jeszcze zwraca uwagę, jeżeli chodzi o uzyskane wyniki, to fakt, że wśród zidentyfikowanych metabolitów prym wiodą aminokwasy. Czy jest to wynik tego, że w ekstraktach komórkowych aminokwasy występują w największych ilościach, czy też jest to wynik zastosowanej metodyki? Bardzo proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do tego pytania.**

W mojej opinii, biorąc pod uwagę cele pracy, ciekawsze są kolejne wyniki pokazujące zmiany w poziomach wewnątrzkomórkowych metabolitów na skutek hodowli komórek przy różnych stężeniach tlenu w określonych przedziałach czasowych. Kiedy hodowle prowadzono przez pierwszych 12 godzin, widma ^1H NMR pozwoliły na identyfikację 21 takich związków. Przede wszystkim były to aminokwasy (14): glutamina, glutaminian, asparagina, asparagian, kwas N-acetylo-asparaginowy, alanina i β -alanina, treonina, izoleucyna, glicyna, tauryna, fenyloalanina, walina, tyrozyna i histydyna, a następnie, hipoksantyna, AMP, UDP-GlcNAc, myo-inozytol oraz fumaran i bursztynian jako

intermediaty cyklu Krebsa. Po kolejnych 12 godzinach, profil metabolitów, których względne ilości zmieniały się znacząco podczas hodowli komórek w różnych stężeniach tlenu, ulegał pewnym zmianom. Z takiego profilu znikaly aminokwasy: glutaminian, asparagina, kwas N-acetylo-asparaginowy, treonina, tauryna i tyrozyna, a także UDP-GlcNaC, myo-inozytol, AMP, fumaran i bursztynian. Natomiast pojawiały się takie związki jak cholina, O-fosfocholina, kreatyna i leucyna. Po 36 godzinach hodowli profil metabolitów podlegał kolejnym zmianom i stawał się bardziej podobny do tego, co stwierdzano po 12 godzinach hodowli. Podobnie, jak po 24 godzinach, stwierdza się brak zmian w ilościach glutaminianu, kwasu N-acetylo-asparaginowego, treoniny, tauryny, fumaranu i bursztynianu, ale ponownie pojawiają się związki znajduwane wcześniej po 12 godzinach, takie jak asparagina, tyrozyna, UDP-GlcNaC, AMP. Znika z kolei kreatyna i kreatynina, natomiast pojawia się mleczan.

W przypadku 8 metabolitów, takich jak aminokwasy: glutamina, alanina i β -alanina, izoleucyna, glicyna, fenyloalanina, walina i histydyna, ich poziomy pozostawały na podobnym poziomie w warunkach hipoksji i normoksji przez cały okres prowadzenia eksperymentu, tzn. przez 36 godzin. Natomiast, w warunkach hyperoksji ilości tych metabolitów znacząco rosły już po 12 godzinnej hodowli i różnice te utrzymywały się do końca trwania eksperymentu. W przypadku pozostałych związków (9) - glutaminian, asparaginian, kwas N-acetylo-asparaginowy i asparagina, UDP-N-GlcNaC, myo-inozytol, AMP, hipoksantyna, bursztynian, ich ilości rosły wraz ze wzrostem stężenia tlenu, przez pierwszych 12 godzin. Po 24 godzinach, podobną sytuację obserwujemy tylko w przypadku asparaginianu, tzn. jego ilości rosną wraz ze wzrostem stężenia tlenu. Natomiast poziom leucyny i choliny nie zmieniał się w hipoksji i normoksji i wzrastał znacząco w hyperoksji. Z kolei, odwrotną sytuację stwierdzono po 24 godzinach w przypadku O-fosfocholiny, której poziom drastycznie spadał w normoksji w porównaniu z hipoksją, i nie zmieniał się w warunkach hyperoksji. Po 36 godzinach hodowli, ilości N-GlcNaC i choliny rosły wraz ze wzrostem stężenia tlenu, natomiast leucyny i mleczanu rosły tylko w hyperoksji.

W podsumowaniu wyników tej części badań, należy stwierdzić, że w komórkach HT1080 hodowanych przy różnych stężeniu tlenu, dochodzi do zmian ilościowych głównie aminokwasów. Stąd powtórzę moje pytanie, **czy jest to wynik tego, że ekstraktach komórkowych aminokwasy występują w największych ilościach, czy też jest wynik zastosowanej metodyki? Czy może są tego inne przyczyny?** Wraz z przedłużającym się czasem hodowli, profile metabolitów podlegają zarówno zmianom jakościowym jak i ilościowym. Co ważne, profile te są bardziej podobne dla komórek analizowanych po 12 i 36 godzinach hodowli w porównaniu z komórkami z 24-godzinnej hodowli. Jest to dowodem na to, że stres komórkowy wywołany, czy to hipoksją, czy to hyperoksją, prowadzi w oby przypadkach do wyraźnych zmian w metabolizmie. **I w przypadku tych wyników, w tekście znajdziemy szereg nieścisłości, kiedy porównuje się go z rycinami. Na przykład, na str. 70, znajdujemy informację,**

że w przypadku 8 metabolitów, takich jak aminokwasy: glutamina, alanina i β -alanina, izoleucyna, glicyna, fenyloalanina, walina i histydyna, ich ilości pozostawały na podobnym poziomie w warunkach hipoksji i normoksji przez cały okres prowadzenia eksperymentu, tzn. po 12, 24 i 36 godzinach, gdy tymczasem brak jest myo-inozytolu i tyrozyny po 24 godzinach. Brak również wyników dla kreatyny na rycinie 11.

Analogiczną strategię, co w przypadku metabolitów wewnątrzkomórkowych, przyjęto i podczas analizy związków uwalnianych przez komórki do środowiska zewnętrznego. A więc, w pierwszym etapie badań zajęto się analizą zmian jakościowych i ilościowych w składzie metabolitów wewnątrzkomórkowych wytwarzanych przez komórki w warunkach hipoksji, normoksji i hyperoksji po 12, 24 i 36 godzinach hodowli. W przypadku komórek rosnących przy 1 %-owym stężeniu tlenu, zidentyfikowano 9 takich najważniejszych metabolitów: glutaminę, S-adenozylhomocysteinę, hipoksantynę, metyloaminę, kwas 3-metylo-2-oksowalerianowy, 2-oksoizokapronian, 3-hydroksymaślan, pirogronian i fumaran. Zwiększenie stężenia tlenu do 6% powodowało drastyczne zmiany w składzie uwalnianych do środowiska związków. Zidentyfikowano 11 takich metabolitów, przy czym, aż 8 z nich, poza glutaminą, pirogronianem i fumaranem, to nowe związki z porównaniu z profilem uzyskanym dla stężenia tlenu 1%. Podobnie jak w przypadku metabolitów wewnątrzkomórkowych, były to przede wszystkim aminokwasy (7): treonina, arginina, metionina, tryptofan, leucyna, walina, asparagina oraz 2-fenylopropionian. W warunkach hyperoksji, tzn. przy 21%-owym stężeniu tlenu, skład wewnątrzkomórkowych metabolitów był najbogatszy (20) i odpowiadał temu, co znaleziono zarówno w warunkach hipoksji jak i normoksji. Dodatkowo stwierdzono obecność izoleucyny, alaniny, choliny, metylomalonianu octanu, mleczanu i mrowczanu.

Jeżeli chodzi o zmiany we względnych ilościach metabolitów związane z czasem prowadzenia hodowli, to jedyne dwa wspólne metabolity dla hipoksji, normoksji i hyperoksji – glutamina i pirogronian zachowywały się podobnie i ich wyraźny spadek obserwowano pomiędzy 12-tą a 24-tą godziną hodowli. W przypadku hipoksji i normoksji, wspólny metabolit – fumaran zachowywał się podobnie i jego ilość wzrastała znacząco między 24-tą a 36-tą godziną hodowli. Również dla normoksji i hyperoksji większość wspólnych metabolitów zachowywała się w podobny sposób i ich ilości spadały wraz z czasem hodowli. Natomiast, odwrotną sytuację obserwowano w przypadku hipoksji i hyperoksji. I tak w przypadku hipoksji większość wspólnych metabolitów wykazywała spadek wraz z czasem hodowli, natomiast ich ilości rosły wraz z czasem hodowli w warunkach hyperoksji. **Uwaga: brak danych dotyczących treoniny na rycinie 18.**

W drugim etapie badań zajęto się analizą zmian w składzie i ilościach wewnątrzkomórkowych metabolitów wynikające z hodowli komórek prowadzonych przy różnych stężeniach tlenu (1%, 6% i

21%) w określonych przedziałach czasowych, tzn. po 12, 24 i 36 godzinach przetrzymywania komórek w tych warunkach. Po 12 godzinach hodowli komórek w różnych stężeniach tlenu zidentyfikowano 12 zewnątrzkomórkowych metabolitów wykazujących największe różnice ilościowe pomiędzy analizowanymi próbkami. Są to aminokwasy: glutaminian, glutamina, piroglutaminian, treonina, tryptofan i leucyna oraz pirogronian, fumaran, kwas 3-metylo-2-oksowalerianowy, 2-fenylopropionian, S-adenozylhomocysteina i β -hydroksymaślan. **Tu uwaga: na str. 94, wymieniając metabolity, których ilości wzrastają wraz czasem hodowli, nie uwzględniono β -hydroksymaślanu.** Po kolejnych 12 godzinach, liczba takich metabolitów spadała do 9. Obok wymienionych powyżej, takich jak pirogronian, S-adenozylhomocysteina, kwas 3-metylo-2-oksowalerianowy, β -hydroksymaślan, piroglutaminian, stwierdzono obecność asparagianu, argininy, 2-oksyzokapronianu i metyloaminy. Wreszcie, po 36 godzinach takich hodowli, liczba zidentyfikowanych metabolitów ponownie wzrasta do 11, a ich skład odpowiada temu, co znaleziono wcześniej (glutaminian, leucyna, 2-oksyzokapronian, metylamina, β -hydroksymaślan, kwas 3-metylo-2-oksowalerianowy, S-adenozylhomocysteina, pirogronian) za wyjątkiem octanu, alaniny i izoleucyny.

Jeżeli chodzi o metabolity, które obecność w pożywce hodowlanej zidentyfikowano przy każdym stężeniu tlenu, takie jak pirogronian, 3-metylo-2-oksopropionian, β -hydroksymaślan i S-adenozylhomocysteina, to ich poziomy zawsze rosły wraz z przedłużającym się czasem hodowli.

Rozdział 2. kończy dyskusja, którą, podobnie jak wyniki, podzielono na dwie części. Pierwsza z nich, nosząca tytuł „*The metabolic changes of intracellular and extracellular metabolome at hypoxia, normoxia and hyperoxia through cultivation time*” odnosi się do wyników uzyskanych dla komórek hodowanych w obecności różnych stężeń tlenu w coraz to dłuższych przedziałach czasowych. Z kolei druga p.t. „*The sensitivity of the HT1080 cell's metabolome to hypoxia, normoxia and hyperoxia at each interval time point*” dotyczy wyników uzyskanych dla komórek hodowanych na przestrzeni tego samego czasu, ale przy różnych stężeniach tlenu. Te części pracy, podobnie jak pozostałe, również zostały napisane fatalną angielszczyzną, co powtórzę znacznie utrudnia, a momentami wręcz uniemożliwia zrozumienie zawartych tam treści. Może po części z tego powodu, nie znajduję odpowiedniego związku pomiędzy wynikami a treścią tych rozdziałów. Zamiast skupić się na omawianiu wyników i w przypadku pierwszego podrozdziału podjąć próby wyjaśnienia, dlaczego poziomy/ilości metabolitów wytwarzanych przez komórki przy różnych stężeniach tlenu zmieniają się wraz czasem hodowli, Doktorant stara się, nieco na siłę, wiązać obserwowane zmiany z fenotypem i metabolizmem komórek nowotworowych. Takie podejście do dyskusji, łączące zmiany w metabolomie ze stopniem natlenowania komórek, pozwoliłoby również lepiej zrozumieć, po co przeprowadzono badania, których celem było pokazanie, jak zmieniają się poziomy różnych metabolitów wytwarzanych przez komórki wraz z przedłużającym się czasem hodowli, kiedy jest ona prowadzona przy różnych

stężeniach tlenu. Z tego, co pisze Doktorant (str. 48), chodziło mu o zbadanie, jak głodzenie komórek wpływa na metabolom komórek hodowanych w warunkach hipoksji, normoksji i hyperoksji. Tymczasem, w mojej opinii, ważniejsze w tym przypadku jest, jak przedłużający się stres oksydacyjny wpływa na metabolizm komórek, i to nie koniecznie nowotworowych. Analogiczna uwaga dotyczy i drugiego podrozdziału, w przypadku, którego nacisk powinien być położony na wyjaśnienie skąd biorą się różnice w poziomach metabolitów produkowanych przez komórki hodowane przy różnych stężeniach tlenu, ale w tych samych przedziałach czasowych. Te uwagi dotyczą wszystkich omawianych w tych podrozdziałach metabolitów, stąd bardziej szczegółowe omawianie każdego z nich zajęłoby zbyt wiele miejsca w tej recenzji. Dlatego, jako przykład takiego, moim zdaniem, nietrafnego podejścia, niech posłuży pierwszy z metabolitów diskutowany w tym rozdziale, a mianowicie UDP-GlcNAc. O ile nie sposób nie zgodzić się, że istnieje pozytywna korelacja pomiędzy poziomami UDP-GlcNAc i glutaminą w warunkach, hipoksji, normoksji i hyperoksji, niezależnie jak długo prowadzona jest hodowla komórek, to nie bardzo rozumiem na jakiej podstawie ta korelacja ma świadczyć, że UDP-GlcNAc działa jako „metaboliczny sensor dostępności energii”. Mimo odwołań do literatury, uważam że tego rodzaju stwierdzenie jest stanowczo za daleko idące. Należy pamiętać, że UDP-GlcNAc jest substratem dla wielu glikozylotransferaz biorących udział w syntezie O- i N-glikanów, dlatego zmiany w jej ilościach są wypadkową szeregu procesów. Podobnie rzecz się ma z kolejnymi zidentyfikowanymi metabolitami wymienionymi w dyskusji, a mianowicie bursztynianem i fumaranem, których obniżone ilości w normoksji i hyperoksji mają według Doktoranta potwierdzać wyniki Denko i wsp., odnoszące się do wpływu tych metabolitów na stabilność HIF1 α , kiedy jego ekspresja nie była przedmiotem badań w tej pracy. Nie mogę też zgodzić się z opisem do ryciny 22 (a nie 24 jak to jest w pracy), że przedstawia ona szlaki metaboliczne w komórkach HT1080 wykryte w oparciu o analizę widm ^1H NMR. Byłoby to zbyt proste, gdyby jedynie w oparciu o przedstawione wyniki można było tworzyć tak złożone schematy. Dodam jeszcze, że omawiając wyniki dotyczące UDP-GlcNAc, Doktorant nie ustrzegł się przed błędami merytorycznymi. Należy pamiętać, że UDP-GlcNAc jest, jak to już napisałem powyżej, substratem dla wielu glikozylotransferaz, stąd skupienie się tylko na jednym enzymie „O-linked β -N-acetyloglukozaminotransferazie” nie ma większego sensu i nie oddaje tego, jaką rolę, a raczej rolę, pełni UDP-GlcNAc w tych komórkach. Na zakończenie tego rozdziału, we wnioskach, Doktorant pisze, że stężenie tlenu jest jednym z kluczowych czynników wpływających na wewnątrzkomórkowy i zewnątrzkomórkowy profil metabolitów wytwarzanych przez komórki, czego wyrazem są różnice w metabolomach obserwowane w warunkach hipoksji i normoksji, a szczególnie hyperoksji. Co należy podkreślić, te różnice mają zarówno charakter jakościowy, jak i ilościowy, czego niestety nie omówiono w tym rozdziale, skupiając się głównie na zmianach ilościowych. Czego mi tutaj brakuje, to jakiegokolwiek hipotezy, która tłumaczyłaby te różnice w kontekście dostępności komórek do tlenu, lub jak kto woli ich natlenowania, przynajmniej, jeżeli chodzi o niektóre ze zidentyfikowanych metabolitów.

Rozdział 3. pt. „*The effect of hypoxia-reoxygenation in HT1080 cell line metabolome by ¹H NMR analysis*” ma układ podrozdziałów analogiczny jak rozdział 2. Zaczyna się krótkim wstępem, który swoją treścią odpowiada bardziej celowi pracy. Celem tej części pracy jest identyfikacja najbardziej prominentnych metabolitów, których poziomy/względne ilości ulegają zmianom podczas przejścia komórek ze stanu normoksji w stan hipoksji i odwrotnie. Kolejny rozdział „Materiały i metody” w ogromnej mierze jest zupełnie zbędnym powtórzeniem tych samych informacji z poprzedniego analogicznego podrozdziału z rozdziału 2. Z powodzeniem można było te podrozdziały scalić w jeden.

Podrozdział „Wyniki” zaczyna się od pokazania krzywych wzrostu komórek HT1080 hodowanych w warunkach analogicznych do hodowli komórkowych, które wykorzystywano do badań metabonomicznych. Kolejny podrozdział poświęcony jest zmianom w wewnątrzkomórkowym metabolomie przy przejściu komórek ze stanu normoksji w stan hipoksji. Wyniki uzyskane za pomocą ¹H NMR pozwoliły na identyfikację najbardziej prominentnych metabolitów, których poziomy/względne ilości ulegają zmianom podczas przejścia komórek ze stanu normoksji w stan hipoksji. W przypadku wewnątrzkomórkowych metabolitów (17) były to aminokwasy (12): leucyna, tyrozyna, walina, izoleucyna, alanina, β-alanina, tauryna, fenyloalanina, glicyna, glutaminian, glutamina, π-metylohistydyna oraz IMP, NAD⁺, AMP, kreatyna, kreatynina, UDP-GlcNAc, sn-glicerolo-3-fosfocholina. **Uwaga: w porównaniu z tekstem, na rycinie 7 brakuje wyników dla AMP i UDP-GlcNAc, natomiast dodano 1-metylonikotynamid.**

Jeżeli chodzi o zewnątrzkomórkowe metabolity, to tych zidentyfikowano 12. Są to aminokwasy: ornityna, alanina, asparagina, glicyna, histydyna, oraz fumaran, octan, metylomalonian, mrówczan i niezidentyfikowany związek-1. **Uwaga: w tekście mylnie podano, że takich metabolitów jest 12, a w rzeczywistości jest ich 10.**

W przypadku wewnątrzkomórkowych metabolitów, przejściu ze stanu normoksji w stan hipoksji towarzyszył generalnie wzrost we względnych ilościach wszystkich zidentyfikowanych metabolitów. Przy czym dla tyrozyny, fenyloalaniny, leucyny i waliny jest to wzrost stopniowy, dla glicyny i waliny taki wzrost obserwuje się dopiero po 24 godzinach, natomiast ilości pozostałych metabolitów wzrastają już po 12 godzinach i dalej ich ilość nie ulega zmianie. Jeżeli chodzi o zewnątrzkomórkowe metabolity, to stopniowy wzrost obserwowano dla fumaranu, alaniny ornityny, octanu, natomiast szybki wzrost już po 12 godzinach bez dalszych zmian, dla metylomalonianu, glicyny histydyny, mrówczanu i asparaginy. Jedynie w przypadku nieznanego związku-1, gwałtowny spadek obserwowano już po 12 godzinach. ,

Kolejny podrozdział dotyczy zmian w wewnątrzkomórkowym metabolomie przy przejściu komórek ze stanu hipoksji w stan normoksji. Znacznie bardziej ograniczony profil

wewnątrzkomórkowych metabolitów zidentyfikowano przy przejściu komórek ze stanu hipoksji w stan normoksji. W tym przypadku obejmował on tylko 6 takich związków, a mianowicie glutaminę, asparaginę, asparaginian, 1-metylonikotynoamid, UDP-GlcNAc i mleczan. Co ciekawe, przy tak ograniczonej liczbie wewnątrzkomórkowych metabolitów, w przypadku zewnątrzkomórkowych metabolitów zidentyfikowano ich aż 17. Znowu, były to przede wszystkim aminokwasy (10): glutamina, asapragina, arginina, tyrozyna, lizyna, metionina, fenyloalanina, walina, izoleucyna, i leucyna, a następnie, ATP, fruktoza, fumaran, mleczan, 2-fenylopropionian oraz niezidentyfikowany związek-1 i niezidentyfikowany związek-2.

Przejściu komórek ze stanu hipoksji w stan normoksji towarzyszył generalnie spadek we względnych ilościach wszystkich zidentyfikowanych metabolitów, za wyjątkiem fumaranu i asparaginy, dla których stwierdzono trend odwrotny.

Ten cały rozdział kończy dyskusja (również podzielona na dwa podrozdziały), która jest nieproporcjonalnie długa i rozwlekła w stosunku do prezentowanych wyników. Prosta obserwacja dotycząca zmian w profilu metabolitów towarzyszących przejściu komórek ze stany normoksji w hipoksję i odwrotnie jest pretekstem do snucia rozważań w większości nie mających oparcia w prezentowanych wynikach. Dla jasności przekazu byłoby znacznie lepiej gdyby ten rozdział nie był podzielony na dwa podrozdziały i wyniki dotyczące przejścia komórek ze stanu normoksji w hipoksję i hipoksji w normoksję były dyskutowane łącznie. Jak już wcześniej napisałem, Autor powinien skupić się na wyjaśnieniach, dlaczego poziomy/względne ilości metabolitów zmieniają się wraz ze stopniem natlenowania komórek, co zresztą dotyczy wszystkich komórek, nie tylko nowotworowych. Zamiast powiązać swoje wyniki z metaboliczną odpowiedzią komórek na stres komórkowy, jakim jest ograniczenie podaży lub nadmierna podaż tlenu, stara się znowu na siłę wiązać obserwowane zmiany z fenotypem i metabolizmem komórek nowotworowych. Przykładem tego jest chociażby dyskusja dotycząca znaczenia zmian w poziomach fenyloalaniny i tyrozyny w komórkach nowotworowych, które nijak się mają do własnych wyników, a której poświęcono prawie dwie strony. Na przykład, nie ma żadnych podstaw stwierdzenie, że „Our findings suggest that under hypoxic conditions activation of genes associated with the inhibition of degradation and increased uptake of phenylalanine and tyrosine can lead to elevated levels of these amino acids in cancer cells under hypoxic conditions.” Aby móc tak napisać, potrzebne by były dodatkowe wyniki w postaci zmian w ekspresji chociażby jednego takiego genu. Analogiczna uwaga dotyczy większości omawianych w tym rozdziale metabolitów. Z drugiej strony, należy przyznać, że tak rozległa dyskusja świadczy bardzo dobrze o znajomości przez Doktoranta piśmiennictwa związanego z tematem jego pracy doktorskiej.

Oba podrozdziały kończą liczne wnioski, które znowu, w większości przypadków nie znajdują oparcia w prezentowanych wynikach. Ponownie ograniczę się do tego samego, co powyżej przykładu, a mianowicie wniosku, który brzmi: „Hypoxia **activates genes** that inhibit degradation and increase uptake of phenylalanine and tyrosine,...”. Aby taki wniosek sformułować potrzebne by były, jak napisałem powyżej, wyniki pokazujące, że ekspresja, przynajmniej jednego z takich genów jest podwyższona, posługując się chociażby PCR w czasie rzeczywistym.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że uzyskane przez Doktoranta wyniki stanowią oryginalną, bardzo cenną bazę danych metabonomicznych do wykorzystania w kolejnych badaniach, których przeprowadzenie pozwoliłoby na weryfikację i potwierdzenie słuszności wniosków zaprezentowanych w tej pracy. I to w opinii recenzenta jest najważniejszą wartością tej pracy. Stąd, pomimo licznych mankamentów, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja, tak ze względu na prezentowaną problematykę, uzyskane wyniki, jak i warsztat badawczy, **spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki**. Stąd wnoszę wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne w Politechnice Wrocławskiej o dopuszczenie Pana Badr Saifa Mohsen Qasama do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 10 sierpnia, 2023 r.



Prof. dr hab. Maciej Ugorski