UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII KLINICZNEJ I DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ

ul. Rokietnicka 3
60-806 Poznań

tel. 61 641 83 03
www.ckdm.ump.edu.pl
blazejr@ump.edu.pl

Poznań, dn. 19.10.2026r.

# Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anoopa Kallingala

Tytuł oryginału:
„Mechanistic studies on selected novel anticancer compounds modulating the function of telomeric proteins”

Tytuł w wersji polskojęzycznej:
„Badania mechanizmów działania wybranych nowych związków przeciwnowotworowych modulujących funkcję białek telomerowych”

Rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk chemicznych.

Recenzję opracowano na podstawie materiałów dostarczonych przez Dziekanat Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej.

Promotorem pracy jest prof. dr hab. inż. Maciej Bagiński a promotorem pomocniczym Pani dr inż. Natalia Maciejewska.

Rozprawa zawiera stosowną deklarację autora odnośnie własności intelektualnej.

Prace badawcze będące podstawą niniejszej rozprawy były realizowane przy wsparciu finansowym Narodowego Centrum Nauki w ramach programu OPUS (grant nr UMO-2023/49/B/NZ7/03456, decyzja z dnia 29 stycznia 2024 r.), którego kierownikiem był prof. dr hab. inż. Maciej Bagiński.

Dorobek doktoranta stanowi 16 artykułów naukowych z listy czasopism punktowanych wg wykazu MNiSW.

## 1. Wprowadzenie i znaczenie podjętej problematyki badawczej

Nowotwory pozostają jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Pomimo ogromnego postępu w diagnostyce i leczeniu nadal istnieje potrzeba identyfikacji nowych celów molekularnych umożliwiających opracowanie skuteczniejszych i bardziej selektywnych strategii terapeutycznych. Szczególne zainteresowanie budzą obecnie telomery oraz związany z nimi kompleks białek szelterynowych, odgrywający kluczową rolę w utrzymaniu integralności genomu, stabilności chromosomów oraz regulacji proliferacji komórek nowotworowych.

Recenzowana rozprawa wpisuje się w aktualny i dynamicznie rozwijający się nurt badań nad terapiami przeciwnowotworowymi ukierunkowanymi na strukturę i funkcję telomerów i białek z nimi związanych. Autor skoncentrował się na analizie nowych pochodnych związku A822 zaprojektowanych jako potencjalne modulatory oddziaływania pomiędzy białkami TRF1 i TIN2. Interakcja ta stanowi jeden z fundamentalnych elementów prawidłowego funkcjonowania kompleksu shelterin, a jej zaburzenie może prowadzić do destabilizacji telomerów, indukcji stresu replikacyjnego, aktywacji odpowiedzi na uszkodzenia DNA oraz ograniczenia potencjału proliferacyjnego komórek nowotworowych.

Podjęta problematyka posiada zarówno znaczenie poznawcze, jak i potencjalnie aplikacyjne. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę dalszych badań nad nową klasą związków przeciwnowotworowych oddziałujących na telomery w sposób odmienny od klasycznych inhibitorów telomerazy.

## 2. Ocena formalna rozprawy

Przedłożona rozprawa liczy 144 strony i została przygotowana w klasycznym układzie pracy eksperymentalnej. Obejmuje streszczenia w języku polskim i angielskim, obszerny wstęp literaturowy, precyzyjnie określone cele badawcze, szczegółowy opis metod, wyniki badań, dyskusję, podsumowanie, bibliografię oraz cztery załączniki zawierające dane uzupełniające.

Praca zawiera liczne ryciny, tabele oraz zestawienia wyników. Na szczególne podkreślenie zasługuje bardzo starannie przygotowany wykaz skrótów, który istotnie ułatwia lekturę tekstu.

Bibliografia obejmuje 219 pozycji literaturowych i została dobrana właściwie. Dominują publikacje z ostatnich lat, jednak Autor uwzględnił również klasyczne prace stanowiące fundament badań nad telomerami, telomerazą i kompleksem shelterin.

Układ pracy jest logiczny, przejrzysty i zachowuje właściwe proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami. Poszczególne części tworzą spójną całość prowadzącą czytelnika od podstaw teoretycznych poprzez hipotezę badawczą do interpretacji wyników eksperymentalnych.

Za jedyny istotniejszy mankament formalny uznaję brak wyraźnie wyodrębnionego rozdziału zawierającego syntetyczne, punktowo przedstawione wnioski końcowe odnoszące się bezpośrednio do założonych celów badawczych.

## 3. Ocena merytoryczna rozprawy

Autor przedstawił dobrze uzasadnioną hipotezę badawczą zakładającą, że związek A822 oraz jego nowo zaprojektowane pochodne mogą wiązać białko TRF1, zaburzać funkcjonowanie telomerów oraz ograniczać wzrost komórek nowotworowych poprzez wpływ na interakcję TRF1-TIN2. Hipoteza została następnie rozwinięta w postaci szczegółowych celów badawczych oraz pytań naukowych.

Na szczególne uznanie zasługuje niezwykle szeroki zakres zastosowanych metod badawczych. Autor przeprowadził między innymi:

- modelowanie molekularne i analizy *in silico*,
- wirtualny screening ponad 18 000 struktur chemicznych,
- symulacje dynamiki molekularnej,
- badania oddziaływań metodą SPR,
- ocenę cytotoksyczności w panelu 24 linii komórkowych,
- badania proliferacji i klonogenności,
- analizy cyklu komórkowego,
- ocenę uszkodzeń DNA,
- analizy zaburzeń replikacji DNA,
- badania długości telomerów metodą Flow-FISH,
- ocenę procesów starzenia komórkowego i apoptozy,
- badania transkryptomiczne RNA-seq,
- eksperymenty na modelach sferoidów 3D,
- badania z wykorzystaniem modelu CAM.

Tak szeroki wachlarz metod pozwolił na kompleksową ocenę biologicznych skutków działania analizowanych związków.

Przedstawione wyniki wskazują, że wybrane pochodne A822 wywierają wielokierunkowy wpływ na komórki nowotworowe. Autor wykazał występowanie zaburzeń replikacji DNA, wzrost liczby uszkodzeń telomerowych, aktywację odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA, ograniczenie proliferacji, zahamowanie migracji komórek oraz zmiany w ekspresji genów związanych z utrzymaniem integralności genomu.

Szczególnie wysoko oceniam wykorzystanie modeli sferoidów trójwymiarowych oraz modelu błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kurzego, które znacząco zwiększają wartość translacyjną uzyskanych wyników.

## 4. Oryginalność pracy i wkład w rozwój dyscypliny

Najistotniejszym osiągnięciem Doktoranta jest identyfikacja nowych pochodnych związku A822 oraz wielopoziomowa charakterystyka ich działania biologicznego. Praca wnosi nowe informacje dotyczące:

- biologicznych konsekwencji zaburzenia funkcji kompleksu szelterynowego,
- związku pomiędzy destabilizacją telomerów a stresem replikacyjnym,
- roli osi TRF1-TIN2 w regulacji przeżycia komórek nowotworowych,
- wpływu zaburzeń telomerowych na odpowiedź komórkową na uszkodzenia DNA.

Niewątpliwie rozprawa stanowi wartościowy i oryginalny wkład w rozwój badań nad molekularnymi mechanizmami funkcjonowania telomerów oraz ich wykorzystaniem jako celu terapii przeciwnowotworowej.

Na wysoką ocenę pracy wpływa również aktywność publikacyjna Doktoranta obejmująca publikacje stanowiące bezpośrednio podstawę metodyczną rozprawy. W dwóch z prac Doktorant jest pierwszym autorem. Jest też pierwszym autorem zgłoszenia patentowego związanego z tematyką prowadzonych badań.

## 5. Uwagi krytyczne i dyskusyjne

Pomimo bardzo wysokiej oceny rozprawy należy wskazać kilka kwestii wymagających dyskusji.
Pewne wątpliwości budzi zasadność bezpośredniego porównywania linii MCF7 i HeLa jako modeli reprezentujących odmienne typy nowotworów, charakteryzujących się znacznymi różnicami biologicznymi i molekularnymi.

Uzyskane wartości IC50 potwierdzają aktywność biologiczną badanych związków, jednak wskazują również na konieczność dalszej optymalizacji chemicznej przed rozważaniem potencjalnych zastosowań przedklinicznych. Nawet korzystne wartości wskaźnika selektywności należy interpretować ostrożnie, ponieważ zastosowany model porównawczy obejmował jedną linię komórek prawidłowych. Kwestia selektywności działania badanych związków wymaga dalszych badań i szerszej walidacji eksperymentalnej.

Wyniki cytotoksyczności odniesiono do prawidłowych komórek gruczołu piersiowego, natomiast dalsze badania mechanistyczne prowadzono między innymi na komórkach HeLa. Uzasadnienie takiego doboru modeli komórkowych mogłoby zostać przedstawione szerzej.

Na stronie 60 (Rycina 5.2) występuje niekonsekwencja dotycząca oznaczenia skrótu ETAPO/ETP. Jest to drobna uwaga redakcyjna, nie wpływająca jednak na interpretację wyników.

Wartościowym uzupełnieniem pracy byłoby określenie bazowego poziomu ekspresji białka TRF1 w badanych liniach komórkowych. Analiza taka mogłaby pomóc wyjaśnić obserwowaną selektywność działania badanych związków oraz różnice pomiędzy poszczególnymi modelami eksperymentalnymi.

W części dotyczącej badań migracji komórek zabrakło jednoznacznej informacji dotyczącej obecności lub braku surowicy w pożywce hodowlanej, co ma znaczenie dla interpretacji wyników testów migracyjnych.

Opis wyników analizy cyklu komórkowego nie zawsze uwzględnia analizę istotności statystycznej. Ponadto bardzo niewielkie wartości odchyleń standardowych przedstawione na części wykresów mogą sugerować przewagę powtórzeń technicznych nad biologicznymi.

Szkoda, że przy szczegółowych badaniach mechanistycznych nie uwzględniono dodatkowej linii komórek nienowotworowych.

Uważam również, że cennym uzupełnieniem analizy procesów starzenia komórkowego byłoby oznaczenie markerów p16 i/lub p21.

W części dyskusji zauważalna jest stosunkowo niewielka liczba cytowań literatury, co ogranicza możliwość szerszego odniesienia uzyskanych wyników do aktualnego stanu wiedzy.

Zwracam także uwagę, że stwierdzenie autora dotyczące pierwszego opisu małocząsteczkowych inhibitorów oddziaływania TRF1-TIN2 wymaga korekty w świetle publikacji Casale i wsp. z roku 2025. Nie umniejsza to jednak innowacyjności rozprawy ani wartości przedstawionych wyników.

W pracy dostrzec można również pojedyncze niedociągnięcia redakcyjne (np. zapis STATEGMED zamiast STRATEGMED), które nie wpływają na jej wartość naukową.

## 6. Pytania do Doktoranta

Oprócz przedstawionych powyżej uwag chciałbym prosić o ustosunkowanie się do następujących kwestii:

Jak Autor wyjaśnia stosunkowo niewielkie zmiany długości telomerów obserwowane metodą Flow-FISH przy jednoczesnym nasileniu uszkodzeń telomerowych i aktywacji odpowiedzi na uszkodzenia DNA?

Jakie potencjalne mechanizmy biologiczne mogą odpowiadać za obserwowaną selektywność działania badanych związków wobec różnych linii komórkowych?

Jakie przesłanki naukowe przemawiały za wyborem linii MCF7 i HeLa jako głównych modeli wykorzystywanych w badaniach mechanistycznych?

Czy Autor planuje dalszą optymalizację chemiczną najbardziej obiecujących pochodnych A822 oraz ich ocenę w modelach *in vivo*?

**7. Wniosek końcowy**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Anoopa Kallingala stanowi wartościowe i oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Autor wykazał się bardzo dobrą znajomością problematyki badawczej, umiejętnością planowania eksperymentów oraz samodzielnego prowadzenia zaawansowanych badań z wykorzystaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej, biologii komórki i chemii obliczeniowej.

Praca w pełni odpowiada wymaganiom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Stwierdzam, że Doktorant wykazał się zarówno odpowiednią wiedzą teoretyczną, jak i umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej z wnioskiem o dopuszczenie mgr. Anoopa Kallingala do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora nauk chemicznych.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy rozprawy, interdyscyplinarny charakter przeprowadzonych badań, bardzo szeroki zakres zastosowanych metod eksperymentalnych, znaczący dorobek publikacyjny Doktoranta oraz potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Podstawą i uzasadnieniem wniosku jest opracowanie przez doktoranta nowego produktu, znacząco lepszego od dotychczasowych, a sam sposób pozyskania, modyfikacji i weryfikacji aktywności biologicznej jest opisany w sposób szczegółowy i precyzyjny. Co więcej zaproponowane rozwiązanie ma duży potencjał wdrożeniowy.

Z wyrazami szacunku,

Błażej Rubiś; PROF. DR HAB.

Digitally signed by Błażej Rubiś; PROF. DR HAB.
Date: 2026.10.19 13:18:17 +02'00'

Prof. dr hab. Błażej Rubiś