



POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

KATEDRA BIOCHEMII I CHEMII MEDYCZNEJ

Adres: 70-111 Szczecin, al. Powstańców Wlkp. 72

Tel./fax: (91) 466-15-30/466-15-16

mail: monika.rac@pum.edu.pl

Szczecin, 4.04.2024

**Ocena osiągnięcia habilitacyjnego oraz dorobku naukowego
doktora nauk farmaceutycznych Roberta Kleszcza
adiunkta w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

Dr Robert Kleszcz jest absolwentem Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, z prawem wykonywania zawodu farmaceuty (nr 14028076). Od początku pracy naukowej związany jest z Katedrą i Zakładem Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, najpierw jako doktorant, następnie asystent a obecnie jako adiunkt. Rozprawę doktorską pt. „Modulacja kanonicznej ścieżki Wnt w komórkach płaskonabłonkowych nowotworów głowy i szyi – poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych” obronił z wyróżnieniem w 2018 roku na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, uzyskując stopień doktora nauk farmaceutycznych.

Ocena osiągnięcia naukowego

Dr Robert Kleszcz jako swoje osiągnięcie naukowe przedstawił cykl pięciu prac, opublikowany w latach 2021-2023, zatytułowany: „Poszukiwanie nowych połączeń inhibitorów ścieżek sygnalizacyjnych i metabolizmu energetycznego glukozy o skutecznym działaniu przeciwnowotworowym wobec komórek płaskonabłonkowych nowotworów głowy i szyi w modelu *in vitro*”. Wszystkie prace powstały po uzyskaniu stopnia doktora. Łączny

Impact Factor powyższego monotematycznego cyklu publikacji wynosi 24.812 (680 punktów MNiSW). Na osiągnięcie składają się cztery prace oryginalne i jedna pogładowa. We wszystkich pracach cyklu dr Kleszcz jest pierwszym autorem. Kluczowym jest fakt opracowania przez habilitanta koncepcji badań, udział w eksperymencie, samodzielne opracowanie statystyczne i zaangażowanie w pełen cykl wydawniczy we wszystkich pracach stanowiących osiągnięcie naukowe. Wszyscy współautorzy przedstawili odpowiednie oświadczenia o zakresie swojego udziału w opublikowanym cyklu prac i są one z godne z deklarowanym przez habilitanta udziałem zarówno w dokumentacji, jak i w wydanych manuskryptach. Osiągnięcie habilitacyjne poświęcone jest badaniu działania przeciwnowotworowego nowych połączeń inhibitorów molekularnych punktów uchwytu w komórkach płaskonabłonkowych raków głowy i szyi, obejmujących ścieżki sygnałowe EGFR, PI3K/Akt, Wnt, Hedgehog, a także demetylazy histonów KDM4 i KDM6 oraz metabolizm energetyczny glukozy. Badania prowadzone były *in vitro* z wykorzystaniem komórek linii płaskonabłonkowego nowotworu krtaniowej części gardła (FaDu), języka (CAL27, SCC-25) oraz przerzutu raka języka do węzłów chłonnych (BICR22), które reprezentują nowotwory HPV-ujemne.

1. Kleszcz Robert, Skalski Marcin, Krajka-Kuźniak Violetta, Paluszczak Jarosław. The inhibitors of KDM4 and KDM6 histone lysine demethylases enhance the anti-growth effects of erlotinib and HS-173 in head and neck cancer cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2021;166:105961. IF: 5.112; punkty MEiN: 100

Celem tego badania była ocena działania przeciwnowotworowego nowych kombinacji molekularnych punktów uchwytu. Erlotinib oraz HS-173 zostały połączone z ML324 oraz GSK-J4, tworząc cztery kombinacje. W celu oceny potencjalnego działania synergistycznego wskazanych połączeń, komórki CAL27 i FaDu inkubowane były ze wzrastającymi stężeniami inhibitorów, łączonych w stałych proporcjach. Wykazano, że użyte kombinacje wywierają synergistyczny efekt na redukcję żywotności oraz indukcję apoptozy komórek CAL27 i FaDu. Zahamowanie progresji cyklu komórkowego oraz aktywacja apoptotycznej śmierci komórek miały odzwierciedlenie w zmianach poziomu ekspresji surwiwiny, cykliny D1 i supresora cyklu komórkowego p21.

2. Kleszcz Robert, Frąckowiak Mikołaj, Dorna Dawid, Paluszczak Jarosław. Combinations of PRI-724 Wnt/ β -catenin pathway inhibitor with vismodegib, erlotinib, or HS-173

synergistically inhibit head and neck squamous cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(13):10448.

IF: 5.600; punkty MEiN: 140

Badania w kolejnej pracy cyklu miały na celu ocenę możliwości polepszenia efektów inhibicji sygnalizacji Wnt poprzez jej ko-inhibicję z substancjami o odmiennym mechanizmie działania. Oceniono trzy funkcjonalne aspekty: progresję cyklu komórkowego i indukcję apoptozy (metodą cytometrii przepływowej) oraz zdolność komórek do migracji (metodą zarastania szczeliny – analiza mikroskopowa). Wyniki badań wskazują, że w komórkach HNSCC jednoczesna inhibicja kanonicznej ścieżki sygnałowej Wnt oraz szlaków EGFR, PI3K lub Hh daje korzyści w zwalczaniu tych komórek nowotworowych. Dla każdego z połączeń wykazano synergizm w redukcji żywotności komórek. Autorzy wskazali połączenia molekularnych punktów uchwytu, które potencjalnie mogą stać się nowymi formami łączonej terapii celowanej dla pacjentów z rakami głowy i szyi.

3. Kleszcz Robert, Paluszczak Jarosław. The combinatorial inhibition of Wnt signaling and Akt kinase is beneficial for reducing the survival and glycolytic activity of tongue cancer cells. *J. Oral Pathol. Med.* 2022;51(3):231-239.

IF: 3.300; punkty MEiN: 100

Celem kolejnej pracy była ocena działania przeciwnowotworowego ko-inhibicji sygnalizacji Wnt i kinazy Akt wobec komórek płaskonabłonkowych nowotworów języka: CAL27, SCC-25 oraz dodatkowo komórek BICR22 będących przerzutem do węzłów chłonnych. Dodatkowo oceniono wpływ inhibitorów na aktywność glikolityczną komórek. Wyniki pracy wskazują na pozytywną ocenę łączonej inhibicji ścieżki sygnałowej Wnt oraz kinazy Akt. Kombinacje inhibitorów potęgowały efekty pojedynczych substancji, a połączenie działania cytotoksycznego i antyproliferacyjnego tych związków jest szczególnie istotne przy zwalczaniu bardziej agresywnych komórek BICR22.

4. Kleszcz Robert, Paluszczak Jarosław. The Wnt signaling pathway inhibitors improve the therapeutic activity of glycolysis modulators against tongue cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(3):1248.

IF: 5.600; punkty MEiN: 140

Praca ta jest kontynuacją koncepcji ingerencji w metabolizm energetyczny glukozy w komórkach płaskonabłonkowych raków języka, czyli przeciwdziałania efektowi Warburga. Celem pracy była ocena wpływu wybranych modulatorów metabolizmu glukozy: 2-deoksyglukozy (2-DG) oraz lonidaminy na przeżycie i aktywność glikolityczną trzech linii komórkowych. Najważniejszą obserwacją jest redukcja zużycia glukozy we wszystkich komórkach nowotworów języka po ko-inhibicji 2-DG i lonidaminy z PRI-724. Wyniki wskazują na możliwość obniżenia żywotności komórek nowotworowych języka poprzez kombinację inhibitorów metabolizmu energetycznego glukozy oraz inhibitorów sygnalizacji Wnt.

5. Kleszcz Robert. Advantages of the combinatorial molecular targeted therapy of head and neck cancer – a step before anakinosis-based personalized treatment. *Cancers* 2023; 15(17):4247.

IF: 5.200; punkty MEiN: 200

Ostatnia praca cyklu jest pracą pogładową. Jej celem było przedstawienie dotychczasowego stanu wiedzy na temat molekularnego podejścia do leczenia raków głowy i szyi. Treść tej pracy w sporej części została umieszczona w dokumentacji habilitacyjnej jako wprowadzenie do osiągnięcia. Praca ta jest cenna nie tylko ze względu na usystematyzowanie wiedzy dotyczącej molekularnych podstaw do tworzenia terapii celowanej w HNSCC, ale także ze względu na konfrontację własnych badań habilitanta oraz zespołów badawczych w których uczestniczył, z doniesieniami innych grup badawczych.

Obecnie postęp w naukach medycznych można uzyskać jedynie drogą szerokiej współpracy, pomiędzy lekarzami-praktykami i biologami molekularnymi. Dlatego za niezwykle ważny uważam udział habilitanta w badaniach, które mogą mieć przełożenie z nauk podstawowych na praktykę kliniczną. Poprawne metodologicznie prowadzenie badań podstawowych i umiejętność interpretacji ich wyników otwiera możliwość kontynuacji badań, także klinicznych i w dalekiej perspektywie przekłada się na skuteczność leczenia chorób. Do najważniejszych efektów badań w przedstawionym przez habilitanta osiągnięciu należą:

1. Potwierdzenie wrażliwości linii komórkowej płaskonabłonkowego raka krtaniowej części gardła (FaDu) i płaskonabłonkowego raka języka (CAL27) na inhibicję demetylaz histonów KDM4 i KDM6.

2. Wykazanie, że połączenia inhibitorów EGFR i PI3K z inhibitorami KDM4 i KDM6 ma synergistyczne działanie wobec redukcji przeżycia linii komórek CAL27 i FaDu.

3. Potwierdzenie korzystnego efektu inhibicji sygnalizacji Wnt w zwalczaniu linii komórek CAL27 i FaDu, a także udokumentowanie nasilenia efektów działania przeciwnowotworowego w wyniku połączeń inhibitora kanonicznej ścieżki Wnt z inhibitorami EGFR i PI3K.

4. Wykazanie, że jednoczesne blokowanie ścieżek Wnt/ β -katenina i Hedgehog powoduje osiągnięcie synergistycznych efektów przeciwnowotworowych wobec linii komórek CAL27 i FaDu.

5. Wykazanie działania hamującego proliferację i redukującego przeżycie linii komórek płaskonabłonkowych raków języka (CAL27, SCC-25 i BICR22) pod wpływem łączonej inhibicji sygnalizacji Wnt oraz modulatorów metabolizmu energetycznego – inhibitora kinazy Akt oraz inhibitorów heksokinazy, tj. 2-deoksyglukozy i lonidaminy.

6. Wykazanie wpływu ograniczenia aktywności szlaku Wnt/ β -katenina na pobór glukozy i wydzielanie mleczanu przez linie komórek raka języka, w tym komórek przerzutowych do węzłów chłonnych.

Dr Kleszcz kontynuował koncepcję badań opracowaną w ramach pracy doktorskiej, rozwinął i pogłębił zagadnienia związane z laboratoryjną oceną działania przeciwnowotworowego nowych kombinacji inhibitorów ścieżek sygnałowych w liniach komórek płaskonabłonkowych raków głowy i szyi. Świadczy to o spójności jego celów badawczych. Za bardzo wartościowe uznaję finansowanie prac w ramach grantu przyznanego habilitantowi przez Narodowe Centrum Nauki (MINIATURA 3, nr 2019/03/X/NZ7/00650, kierownik grantu).

Moje zastrzeżenia dotyczą tego, że opisane badania opierały się o linie komórkowe, nie były badaniami klinicznymi. Zatem zawarte w autoreferacie stwierdzenie habilitanta: „Do moich najważniejszych osiągnięć opisanych w cyklu prac należy umiejscowienie przeprowadzonych badań na ważnym etapie rozwoju leczenia płaskonabłonkowych raków głowy i szyi i wskazanie ich znaczenia dla dalszego postępu terapii.” uważam za nieuzasadnione. Jednak poszukiwanie mechanizmów molekularnych pozwalających na zrozumienie przebiegu leczenia onkologicznego i obserwacji klinicznych jest istotne. Opisane powyżej prace mogą posłużyć jako punkt wyjściowy do dalszych badań zarówno habilitantowi, jak i innym badaczom w ostatecznej próbie połączenia standardowych celów molekularnych terapii w HNSCC z kontrolą mechanizmów regulacji epigenetycznej. Habilitant znacznie ostrożniejsze wnioski niż w dokumentacji sformułował w drugiej pracy cyklu. Za słabszą stronę uznaję także opublikowanie trzech z pięciu prac w płatnym

wydawnictwie MDPI. Habilitant nie pokusił się też choćby o próbę wyjaśnienia, jak użycie toksycznych dawek inhibitorów szlaków sygnałowych EGFR, PI3K/Akt, Wnt, Hedgehog, inhibitorów glikolizy na etapie heksokinazy i inhibitory oddychania komórkowego wpływałyby na skuteczność terapii antynowotworowej *in vivo* lub przeżywalność innych komórek niż nowotworowe. Zagadnienia te z pewnością stanowią dalsze cele badawcze.

Niewątpliwie wskazanie punktów uchwytu inhibitorów ścieżek sygnałowych w liniach komórkowych ma znaczenie dla dalszego postępu w opracowaniu terapii płaskonabłonkowych raków głowy i szyi. Dlatego uważam, że wskazane przez habilitanta osiągnięcie naukowe stanowi znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych.

Ocena aktywności naukowej

Ocena dorobku naukowego (poza osiągnięciem)

Według analizy bibliometrycznej przygotowanej przez Bibliotekę Główną Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu aktualny dorobek naukowy dr Kleszcza, z wykluczeniem prac wskazanych jako osiągnięcie naukowe, obejmuje 29 prac, w tym 23 prace oryginalne, 5 poglądowych, 1 rozdział w podręczniku. Habilitant jest pierwszym autorem w 8 pracach. Całkowity IF prac wynosi 100.711, a liczba punktów MNiSW 2340. Łączna liczba cytowań (bez autocytowań) wg bazy Web of Science to 364. Indeks Hirscha wynosi 12. Uzupełnieniem dorobku jest 27 streszczeń zjazdowych, w tym 7 ze zjazdów międzynarodowych. Tematyka publikacji habilitanta jest bardzo spójna i dotyczy modulacji ścieżek sygnałowych komórek należących do linii płaskonabłonkowych nowotworów głowy i szyi, nowotworów trzustki, wątroby i jelita grubego oraz nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (glejaki). Choć ilość prac z pierwszym autorstwem oraz ogólna liczba publikacji mogłaby być większa, to jednak wartość IF i indeksu Hirscha wskazują na wysoką jakość prac i zainteresowanie nimi w środowisku naukowym. Jak wynika z dokumentacji, w pracach, w których habilitant nie jest pierwszym autorem, wniósł bardzo duży wkład w zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentów. Dr Kleszcz podjął współpracę z sześcioma ośrodkami naukowymi w kraju: Wielkopolskim Centrum Onkologii w Poznaniu, Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie, Instytutem Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, Wielkopolskim Centrum Zaawansowanych Technologii, Uniwersytetem im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz Instytutem Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie. Owocem nawiązanej współpracy są publikacje naukowe. Badania naukowe habilitant prowadził w ramach współwykonawstwa grantów finansowanych

przez Komisję Europejską oraz NCN. Na prośbę licznych czasopism, w tym z IF, dr Kleszcz wykonał 63 recenzje prac naukowych. Za swoją działalność naukową dr Kleszcz otrzymał liczne wyróżnienia oraz nagrody rektora Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Habilitant odbył także dwa krótkie staże zagraniczne: naukowy w Institut für Experimentelle Tumorforschung, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kilonia, Niemcy (3 miesiące) oraz staż szkoleniowy w jednostkach badawczych firmy farmaceutycznej Zentiva k.s., Praga, Czechy (1 miesiąc). Niestety w wyniku tej współpracy nie powstała żadna wspólna publikacja, ale habilitant z pewnością zdobył doświadczenie, które wykorzystał w swojej pracy naukowej.

W podsumowaniu stwierdzam, że dorobek naukowy dr Roberta Kleszcza w pełni spełnia wymagania dla osób ubiegających się o stopień doktora habilitowanego a habilitant wykazuje się istotną aktywnością naukową.

Ocena dorobku dydaktycznego

Dr Kleszcz najpierw jako asystent a następnie jako adiunkt odpowiedzialny był za prowadzenie zajęć dydaktycznych w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UMP z przedmiotów:

- biochemia (ćwiczenia i seminaria) dla studentów polsko i anglojęzycznych II i III roku kierunku Farmacja, II roku kierunku Analityka Medyczna, II roku kierunku Kosmetologia, II roku kierunku Analityka Kryminalistyczna i Sądowa, II roku kierunku Inżynieria Farmaceutyczna
- biologia molekularna (ćwiczenia i seminaria) dla studentów polsko i anglojęzycznych III roku kierunku Farmacja i II roku kierunku Analityka Kryminalistyczna i Sądowa
- enzymologia (ćwiczenia i seminaria) dla studentów II roku kierunku Biotechnologia Medyczna
- molekularne podstawy leczenia nowotworów (seminaria) dla studentów III roku kierunku Farmacja (przedmiot ten współtworzył).

Habilitant był łącznie opiekunem 8 prac magisterskich (studenci V roku kierunku Farmacja i Analityka Medyczna) oraz promotorem i opiekunem 14 prac magisterskich (studenci V roku kierunku Farmacja i Analityka Medyczna), promotorem 4 prac licencjackich (studenci III roku kierunku Biotechnologia Medyczna oraz Analityka Kryminalistyczna i Sądowa) oraz pracy inżynierskiej na kierunku Inżynieria Farmaceutyczna. Dr Kleszcz pełnił funkcję opiekuna podczas miesięcznego stażu naukowego studentki kierunku Farmacja z Peru

oraz uczestniczył w opiece nad studentami (ze Słowacji i z Iranu) odbywającymi praktyki wakacyjne organizowane przez International Pharmaceutical Students' Federation. Przez rok był opiekunem Studenckiego Koła Naukowego Biochemii Farmaceutycznej. W mojej ocenie dr Kleszcz jest niezwykle aktywnym dydaktykiem.

Ocena dorobku organizacyjnego

Habilitant jest od 2014 r. członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, a od 2023 r. członkiem Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego. Dr Kleszcz jest osobą bardzo zaangażowaną w życie macierzystej uczelni. W latach 2018-2022 pełnił funkcję opiekuna roku kierunku Farmacja, w 2020 r. był członkiem komisji mandatowej podczas wyborów władz uczelni na kadencję 2020-2024, w 2021 r. był recenzentem oraz członkiem jury w 57. konkursie prac magisterskich Wydziału Farmaceutycznego UMP, w latach 2021-2022 był recenzentem wniosków o finansowanie badań naukowych w ramach konkursów grantowych Szkoły Doktorskiej UMP, od września 2022 r. jest członkiem Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Ponadto od czerwca 2023 r. habilitant pełni funkcję Guest Editor w czasopiśmie Cancers (IF 5.2 i 200 punktów MEiN) w ramach Wydania Specjalnego Feature Review for Cancer Therapy, w sekcji Cancer Therapy.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że kandydat spełnia wszystkie wymogi niezbędne do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego w zakresie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, określonych ustawą z dn. 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” i przedkładam wniosek do Kapituły Kolegium Nauk Farmaceutycznych, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o nadanie dr n. farm. Robertowi Kleszczowi stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

prof. dr hab. Monika Rać
diagnosta laboratoryjny
specjalista zdrowia publicznego
Zakład Biochemii PUM

06056