



Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Medycznych
Instytut Nauk Medycznych

Dr hab. n. med. Anna Żaczek, prof. UR

Rzeszów, 15.09.2022

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Anny Maciei pt. „Identyfikacja mechanizmu
uwrażliwiania komórek ludzkiego raka jajnika na leki przeciwnowotworowe za pomocą
inhibitorów szlaków naprawy podwójnych pęknięć DNA”**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Anny Maciei, wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej Instytutu Biochemii WBiOŚ Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem prof. dr hab. Tomasza Popławskiego, ma postać obszernej monografii obejmującej łącznie 170 stron, opracowanej bardzo starannie i zgodnie z wymogami przyjętymi dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych.

Dołączony do rozprawy dotychczasowy dorobek naukowy Doktorantki obejmuje 10 artykułów opublikowanych w wysoko punktowanych czasopismach w latach 2014 – 2022. Badania będące przedmiotem rozprawy doktorskiej wpisują się w dotychczasowy nurt badawczy Doktorantki i można przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości badania te przyczynią się do powiększenia jej dorobku publikacyjnego. Na uwagę zasługują fakt, że fundusze na badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej Doktorantka pozyskała z kilku źródeł: dotacji celowej dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich (w trzech kolejnych latach 2016, 2017, 2018) oraz projektu Narodowego Centrum Nauki PRELUDIUM 12 (DEC-2016/23/N/NZ7/02023), którego była kierownikiem.

Rak jajnika jest jednym z najczęściej wykrywanych nowotworów u kobiet. Polska ma wysoki wskaźnik zapadalności na raka jajnika (12,4/100 000 w 2020) oraz wysoki współczynnik umieralności z powodu tej choroby (7,2/100 000 w 2020). Obecnie stosowanym schematem leczenia jest chemioterapia, często poprzedzona zabiegiem chirurgicznym. W chemioterapii raka jajnika wykorzystywane są pochodne platyny, zwykle w połączeniu z taksanami. Większość stosowanych w chemioterapii polega na uszkodzeniu DNA w szybko dzielących się komórkach, w tym nowotworowych. Niestety, komórki nowotworowe mają zdolność nabywania oporności na stosowane leki m.in. poprzez

podwyższenie efektywności naprawy uszkodzeń DNA indukowanych działaniem leków. Oporność komórek raka na leki przeciwnowotworowe osłabia efekt leczenia, prowadzi do progresji choroby oraz wpływa na pogorszenie rokowań. Blokowanie naprawy uszkodzeń DNA poprzez stosowanie specyficznych inhibitorów jest obiecującym kierunkiem badań nad uwrażliwieniem komórek nowotworowych na stosowane chemioterapeutyki. Identyfikacja mechanizmu uwrażliwiania komórek ludzkiego raka jajnika na często stosowane w terapii tej choroby cisplatynę (CDDP) i etopozyd (VP-16) za pomocą inhibitorów szlaków naprawy podwójnych pęknięć DNA wpisuje się w ten kierunek badań i stanowi przedmiot przedłożonej do recenzji dysertacji. Podjętą w pracy tematykę uważam za w pełni uzasadnioną i ważną, także w kontekście braku wysoce skutecznych i jednocześnie bezpiecznych terapii raka jajnika.

Do eksperymentów Doktorantka wybrała panel sześciu linii komórkowych ludzkiego raka jajnika różniących się wrażliwością na CDDP oraz pięć inhibitorów szlaku naprawy podwójnych pęknięć nici DNA (DSBs). Trzy z użytych inhibitorów działają na szlak homologicznej rekombinacji (HR), pozostałe dwa hamują aktywność szlaku naprawy przez niehomologiczne łączenie końców (NHEJ). Ciekawi mnie jakie było kryterium wyboru stosowanych w pracy inhibitorów. Czy zasadnym nie byłoby dołączenie do badań inhibitorów oddziałujących również na inne szlaki naprawy DNA, szczególnie systemu NER, skoro wiadomo, że to właśnie ten mechanizm usuwa modyfikacje cząsteczek DNA wprowadzone przez cisplatynę? W badaniach *in vitro* wykazano, że spironolakton (SP), inhibitor systemu NER, uwrażliwia ludzkie komórki raka jajnika i okrężnicy na cisplatynę i oksaliplatynę (Alekseev S. i in., Chem. Biol. 2014). Wciąż trwają badania mające na celu poszukiwanie inhibitorów NER (Kiss RC i in., Int J Mol Sci 2021). Czy dostępne są SP i inne nietoksyczne inhibitory NER? Czy użycie takich inhibitorów w badaniach byłoby możliwe i czy dostarczyłoby to wartościowych danych?

Wszystkie wybrane do badań linie komórkowe pochodzą z Europejskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ECACC). Charakterystyka tych linii podana w rozdziale Materiały nie obejmuje profili genetycznych. Wiadomo, że wiele zaburzeń na poziomie molekularnym w raku jajnika dotyczy genów zaangażowanych w szlaki odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA (DDR), co skutkuje zaburzeniami w działaniu tych mechanizmów. Obszerniejszą charakterystykę linii i uzasadnienie ich wyboru znajdują dopiero w rozdziale Dyskusja. Czy dobrze wnioskuję z podanych tam informacji, że linia A2780 jest pozbawiona mutacji w genach TP53, BRCA1 i/lub BRCA2? Czy należy rozumieć, że „pozbawione wad modelu U1” linie układu U2 i U3 (odpowiednio PEA1/PEA2 i PEO1/PEO4) posiadają mutacje w tych genach? A co z innymi genami DDR? Czy dostępne są takie informacje? Uwzględnienie obecności ewentualnych mutacji w genach szlaków

naprawy uszkodzeń w badanych liniach komórkowych jest wartościowe w kontekście interpretacji wyników.

W badaniach będących przedmiotem przedłożonej do recenzji pracy Doktorantka określała cytotoksyczność badanych chemioterapeutyków wyznaczając wskaźniki zdolności do uwrażliwiania komórek na leki (Rf) oraz wskaźniki kombinacji (CI) stosowanych leków wskazujące na rodzaj oddziaływań pomiędzy poszczególnymi związkami. Dla określenia genotoksyczności (oceny poziomu uszkodzeń DNA) zastosowała test kometowy oraz metodę oznaczania poziomu ufosforylowanego histonu H2AX z użyciem cytometru przepływowego. Zbadła także wpływ testowanych inhibitorów na wydajność naprawy podwójnych pęknięć nici DNA (DSBs), modulację cyklu komórkowego oraz indukcję apoptozy. W warunkach hipoksji oceniła ekspresję genów związanych z DDR z użyciem komercyjnego zestawu i odpowiedniej aplikacji. Stosowane w pracy metody opisane są w jasny, przejrzysty sposób pozwalający na ich odtworzenie. Nie mam żadnych zastrzeżeń dotyczących wyboru zastosowanych metod i technik badawczych. Ich wykorzystanie świadczy opanowaniu przez Doktorantkę bogatego warsztatu metodycznego.

Doktorantka wskazała jako najefektywniej działające cytotoksycznie kombinacje CDDP/VP-16 z inhibitorami NHEJ na linii U1 i U2. Potwierdziła skuteczność działania inhibitorów jako czynników wzmagających genotoksyczność leków przeciwnowotworowych oraz spowalniających procesy naprawy DNA (szczególnie inhibitorów NHEJ względem linii U2 oraz jeden inhibitor HR względem linii U1). Wykazała zahamowanie cyklu komórkowego spowodowane akumulacją komórek w fazie G2/M (szczególnie w przypadku linii U2) oraz wzrost poziomu kaspazyli indukcję apoptozy w odpowiedzi na działanie CDDP/VP-16 z inhibitorami NHEJ.

Częstym zjawiskiem występującym w nowotworach, także powszechnym w przypadku nowotworów jajnika, jest niższy niż fizjologiczny poziom tlenu w komórkach. Ograniczony dostęp tlenu (hipoksja) powoduje obniżenie wrażliwości komórek na leki i pogorszenie rokowań. Jest to też jeden z czynników warunkujących cisplatinooporność w raku jajnika.

Za szczególnie wartościowe dla pracy uważam porównanie wyników uzyskanych uprzednio dla kombinacji CDDP/VP-16 i inhibitorów NHEJ w warunkach tlenowych z wynikami uzyskanymi dla tych związków i komórek U2 w warunkach hipoksji. Doktorantka wykazała wzrost efektu cytotoksycznego CDDP/VP-16 ale tylko w przypadku inhibitorów NHEJ i linii cisplatinowrażliwej (PEA1). W warunkach hipoksji badane inhibitory nie zwiększyły genotoksycznego działania leków na obie badane linie U2. Doktorantka wykazała redukcję pozytywnego wpływu inhibitorów NHEJ, a w przypadku inhibitorów HR nawet

spadek cytotoksyczności CDDP/VP-16 na komórki linii U2w porównaniu do wyników uzyskanych dla samych leków. Inhibitory nie wpłynęły na cykl komórkowy (brak akumulacji komórek w punkcie kontrolnym G2/M). Wpłynęły natomiast na apoptozę (3-krotny wzrost poziomu kaspaz) ale tylko w przypadku linii cisplatynoopornej PEA2. Te interesujące wyniki wymagają głębszej interpretacji lub dalszych badań. Doktorantka wykazała także, że brak tlenu moduluje ekspresję genów, które odgrywają rolę w odpowiedzi komórki na pojawienie się uszkodzeń DNA. Wykazała zmiany poziomu ekspresji licznych genów zaangażowanych w szlak apoptozy, szlak sygnałowy ATM/ATR oraz szlaki naprawy uszkodzeń DNA w przypadku obu linii układu U2 (większe w przypadku linii cisplatynoopornej). Badane 84 geny wymienione są w Tabeli 10, natomiast Tabela 32 przedstawia schemat rozmieszczenia starterów umożliwiający pomiar ekspresji badanych genów na płycie 96-dółkowej. Skoro płytka jest 96-dółkowa zastanawia brak rzędu H. Nie znajduję też informacji jakie geny użyte zostały jako genyreferencyjne. Rycina 50 przedstawia „przykładowe” wyniki badania poziomu ekspresji genów DDR dla linii PEA2 w warunkach tlenowych. Zauważam zbieżność tych wyników z wynikami z Tabeli 34, które prezentują poziom ekspresji genów DDR w linii PEA2 w warunkach hipoksji. Czy te doświadczenia były wykonane w powtórzeniach? Tabele 33 i 34 dostarczają ogromu danych na temat obniżonej ekspresji większości badanych genów, szczególnie w przypadku w linii PEA2 oraz wzrostu ekspresji w przypadku nielicznych genów. Czy Doktorantka ma plany na dalsze wykorzystanie tych danych?

W związku z rozwojem medycyny spersonalizowanej coraz powszechniejsze w leczeniu nowotworów staje się tzw. leczenie celowane. Na zakończenie chciałabym zapytać Doktorantkę na czym polega taka terapia i czy możliwe jest lub będzie jej zastosowanie w przypadku raka jajnika?

Praca doktorska napisana jest bardzo ładnym językiem używanym w tekstach o charakterze naukowym. Bogate piśmiennictwo (228 pozycji) jest cytowane poprawnie. Rozprawa zawiera bogaty wykaz skrótów, których wyjaśnienie także pod rycinami jest bardzo użyteczne oraz starannie wykonane ryciny i tabele. Szczególnie użyteczne są informacyjne tytuły rycin w części eksperymentalnej pracy. Wstęp i Dyskusja napisane są w sposób świadczący o wyczerpującym zgłębieniu tematu, dużej wiedzy Doktorantki oraz Jej umiejętnościach w zakresie krytycznej interpretacji wyników. Doktorantka nie ustrzegła się jednak drobnych błędów językowych, które jak recenzent pozwolę sobie wymienić:

- na str. 3 rozprawy punkt 2.2 powinno być „Czynniki genetyczne” zamiast „Czynniki pozagenetyczne”,
- na str. 104 zapisano, że „odnotowano także 2-3 krotny **spadek** ekspresji kilku genów” tymczasem, jak pokazuje Tab. 33, chodzi o wzrost ekspresji,
- na str. 122 w zdaniu uzasadniającym wybór testu kometowego: „Zdecydowano się na wybór wersji alkalicznej z powodu prawdopodobieństwa pojawienie się innych niż dwuniciowe uszkodzeń, które

mogłyby zostać niezauważone w przypadku zastosowania wersji **alkalicznej**", powinno być „neutralnej”,

- na str. 88 w zdaniu „wykluczono zdolność DRIs do indukowania uszkodzeń DNA w komórkach linii **U1-U3**” powinno być „linii U1-U2” ponieważ linie układu U3 na tym etapie zostały już wyłączone z badań,

- różna pisownia nazwy czynnika transkrypcyjnego: HIF1A, HIF1A lub Hif1A (str. 99 i 125),

- niepoprawne określenie w zdaniu „odsetek uszkodzeń DNA jest **równy poniżej** 10% niezależnie od obecności DRIs” (str. 109),

- inne drobne literówki takie jak: „produkty białkowy” (str. 17), „detektory – białka białek” (str. 22), „cząsteczka doscelowa” (str. 43), brak spacji „przydługości” (str. 51), VP-6 zamiast VP-16 (str.78), brak „w” (str. 59), niepotrzebne „na” (str. 104), brak „z” (str. 111), „gruczoakoraka” (str. 117), „Dale literaturowe” (str. 124), „oby” zamiast „obu” (str. 126), „genetyczny” zamiast „genetycznym” (str. 128).

Powyższe niedociągnięcia są nieliczne, szczególnie przy tak obszernej rozprawie i nie umniejszają wartości przedłożonej pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Uzyskane rezultaty badań są w pełni oryginalnymi osiągnięciami naukowymi o charakterze twórczym. Wyrazy uznania kieruję nie tylko do Doktorantki ale i Promotora, prof. Tomasza Popławskiego.

Niniejszym stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca doktorska spełnia wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Anny Maciei do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. n. med. Anna Żaczek, prof. UR