



Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Katedra Genetyki Molekularnej

**dr hab. Tomasz Śliwiński prof. nadzw. UŁ**

Łódź, dnia 22 lipca 2016 r.

**Katedra Genetyki Molekularnej**

**Uniwersytetu Łódzkiego**

### **O c e n a**

**pracy doktorskiej mgr Beaty Talar**

**pt.: „*MOLEKULARNE MECHANIZMY DZIAŁANIA PENTOKSYFILINY W  
KOMÓRKACH CZERNIAKA*”**

Czerniak jest to jeden z najbardziej agresywnych nowotworów, ze względu na jego szybkie tempo wzrostu oraz przerzutowanie. Rozwija się w obrębie znamion barwnikowych. Wywodzi się z komórek barwnikowych skóry – melanocytów, które są komórkami macierzystymi znamion. Czerniak, to tak na prawdę heterogenna grupa nowotworów, której typy różnią się objawami i przebiegiem choroby tj. czerniak szerzący się powierzchniowo, czerniak powstający na plamie soczewicowatej, czerniak guzkowaty, czerniak bezbarwnikowy czy czerniak akralny lub podpaznokciowy. Głównymi czynnikami ryzyka wystąpienia czerniaka jest zwiększona ekspozycja na promieniowanie UV oraz jasna karnacja. Prawdopodobieństwo zachorowania wzrasta po 20 roku życia, a największe jest w wieku 50 – 64 lat. Do grupy zwiększonego ryzyka kwalifikują się również osoby z dodatnim wywiadem rodzinnym, czyli występowaniem czerniaka u bliskich krewnych. Czerniak staje się obecnie ogromnym problemem, zwłaszcza w krajach, w których dużą część populacji stanowią osoby o jasnej karnacji. Najbardziej narażone są osoby odmiany kaukaskiej. Rocznie na świecie czerniaka wykrywa się u blisko 100000 osób. Dzięki swojemu położeniu geograficznemu, Polska należy do krajów o dość niskiej zachorowalności na ten typ nowotworu (6 osób na 100000). Obecnie leczenie tego nowotworu polega głównie na radykalnym wycięciu nowotworu, z dużym marginesem tkanki, niejednokrotnie wraz z wartowniczymi węzłami chłonnymi. Pomimo tak radykalnego postępowania, niejednokrotnie dochodzi do nawrotu choroby. Dodatkowo,

czerniak charakteryzuje się także niską odpowiedzią na chemioterapeutyki. Leczenie czerniaka opiera się obecnie raczej na łagodzeniu objawów, niż kompletnym leczeniu i nie opracowano, jak dotąd jego skutecznej terapii. Uzasadnione jest zatem poszukiwanie nowych strategii leczniczych, opartych o związki adjuwantowe, które mogłyby wspomóc obecnie stosowane terapie.

Jednym ze związków-kandydatów wydaje się być pentoksyfilina, związek pochodzenia roślinnego, wykorzystywany w terapii paliatywnej chorych w zaawansowanym stadium nowotworów. Związek ten uwrażliwia komórki nowotworowe na radio- i chemioterapię, dodatkowo wykazując bezpośredni potencjał przeciwnowotworowy. Jako, że komórki czerniaka posiadają m.in. zdolność samoodnowy, co stanowi cechę nowotworowych komórek macierzystych opornych na stosowane terapie, i dodatkowo komórki czerniaka rosnąc w medium dla komórek macierzystych charakteryzują się wysoką klonogennością oraz podwyższoną aktywnością kanonicznego szlaku WNT, zasadnym było postawienie hipotezy badawczej, że aktywność pentoksyfiliny w komórkach czerniaka, rosnących w takim podłożu, może być związana ze zdolnością tego związku do regulacji tego ważnego szlaku przekazywania sygnałowego.

Ze względu na brak wiedzy dotyczącej zdolności hamowania kanonicznego szlaku WNT (jak wydaje się bardzo istotnego dla rozwoju tego typu nowotworu) przez pentoksyfilinę, jak również, że hamowanie to może mieć szczególne znaczenie w terapii skierowanej przeciwko komórkom macierzystym i immunoterapii, uważam za bardzo zasadne podjęcie badań zaprezentowanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej, szczególnie istotnych z punktu właściwego zrozumienia patologii tego schorzenia, jak i wyznaczenia nowych kierunków terapeutycznych.

Oceniana rozprawa ma typowy układ dysertacji doktorskiej. W części poglądowej (29 stron) Doktorantka opisała kilka zagadnień pozostających w ścisłym związku z wykonywanym projektem badawczym. Mgr Beata Talar opisała czerniak, podając jego różne postacie, podkreślając jego heterogenność, wskazując tę cechę, jako jedną z przyczyn niskiej skuteczności leczenia tego nowotworu. W dalszej części wstępu Doktorantka przybliżyła pentoksyfilinę, związek pochodzenia naturalnego, wykorzystywany w terapii paliatywnej chorych w zaawansowanym stadium nowotworów, głównie jako czynnik uwrażliwiający komórki nowotworowe na chemio- i radioterapię, ale także jako ten, który wykazuje bezpośredni potencjał przeciwnowotworowy. Jako, że praca doktorska skupia się jedynie na kanonicznym szlaku WNT, Autorka nie dokonywała opisu szlaków niekanonicznych WNT tj. zależnego od jonów wapnia czy polarnego, a dokładnie scharakteryzowała szlak kanoniczny oraz białko  $\beta$ -kateninę, które jest jego kluczowym elementem. W rozdziale tym Pani mgr Beata Talar dodatkowo dokonała opisu wybranych genów regulowanych przez kanoniczny szlak WNT, w związku z ich rolą w powstawaniu nowotworów. Następnie Doktorantka przybliżyła możliwy mechanizm transformacji nowotworowej melanocytów, oparty o kanoniczny szlak WNT, podając najczęstsze zmiany genetyczne i epigenetyczne w genach kodujących jego elementy, występujące w różnych nowotworach, w tym w czerniaku. Na koniec Autorka opisała rolę kanonicznego szlaku WNT w progresji oraz immunosupresji czerniaka. Część ta została poparta,

bardzo dobrze dobranymi, pozycjami literaturowymi, w większości pochodzącymi z ostatnich kilku lat. Bardzo czytelny wykaz skrótów pozwala na łatwe zapoznawanie z treścią zawartą w rozprawie.

Głównym celem pracy była, niepodjęta do tej pory, analiza efektów komórkowych indukowanych przez pentoksyfilinę w komórkach czerniaka, w tym ocena właściwości cytotoksycznych oraz cytostatycznych badanego związku, jak również określenie względnej aktywności kanonicznego szlaku WNT w badanych populacjach komórek czerniaka oraz wpływu pentoksyfiliny na aktywność TCF/LEF i  $\beta$ -kateniny, a poziom ekspresji genów docelowych oraz kodujących elementy kanonicznego szlaku WNT, czy też ekspresję czynnika transkrypcyjnego MITF-M, w komórkach czerniaka.

Materiał do badań stanowiło 5 linii komórkowych czerniaka, wyprowadzonych, w Zakładzie Biologii Molekularnej Nowotworów UMED, z guzów pacjentów Kliniki Chirurgii Onkologicznej Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

W swojej pracy Doktorantka zajęła się (jak wspomniałem powyżej w celu pracy) analizą względnego poziomu ekspresji zarówno genów kodujących czynniki kanonicznego szlaku WNT, jak również ekspresji genów docelowych dla działania jego produktów, w porównaniu tego profilu w komórkach czerniaka traktowanych pentoksyfiliną. Dodatkowo Autorka skupiła się na analizie efektów komórkowych indukowanych, w komórkach czerniaka, przez pentoksyfilinę oraz określiła poziom i lokalizację aktywnej  $\beta$ -kateniny.

Uzyskane wyniki są jednoznaczne, i za każdym razem bardzo dobrze udokumentowane. Wyniki badań własnych Doktorantka zilustrowała za pomocą przejrzystych, dobrze skonstruowanych i opisanych 9 rycin. W mojej ocenie, bardzo dobry sposób przedstawienia tak obszernej puli wyników uzyskanych przez Doktorantkę świadczy o dużej dojrzałości naukowej Autorki recenzowanej rozprawy doktorskiej. Ta wydająca się mała liczba rycin, w odniesieniu do tak dużej puli wyników, charakteryzuje się pełnym profesjonalizmem, na jaki mogą zdobyć się tylko osoby publikujące w bardzo znaczących i prestiżowych czasopismach naukowych (mała liczba rycin, za to z dużą liczbą paneli dobrze zilustrowanych i oddających charakter uzyskanych wyników). Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż każdorazowo, przed wykonaniem kolejnego eksperymentu, komórki stanowiące materiał to badań, były dokładnie charakteryzowane z wykorzystaniem cytometru przepływowego oraz mikroskopii, w celu uniknięcia błędu wynikowego, czy też artefaktu, opartego o niewłaściwie użyty materiał biologiczny (zmieniona charakterystyka czy morfologia komórek). Godne podkreślenia jest to, iż podczas realizacji zadań badawczych mgr Beata Talar opanowała i zastosowała bardzo szeroki, ponadprzeciętny wachlarz metod biologii molekularnej, wymagających syntetycznego myślenia, precyzji oraz czasu.

Dobrze zaplanowany projekt badawczy i jego konsekwentna realizacja z wykorzystaniem właściwie dobranych metod oraz wnikliwa ocena statystyczna otrzymanych wyników zaowocowała uzyskaniem interesujących, oryginalnych ustaleń, m.in.

- Wykorzystane w badaniach populacje komórek czerniaka wykazywały zróżnicowaną aktywność kanonicznego szlaku WNT.
- Czynniki transkrypcyjne kanonicznego szlaku WNT jak LEF1 oraz TCF4 ulegały zróżnicowanej ekspresji w komórkach czerniaka.
- Pentoksyfilina działała cytotoksycznie wobec wszystkich badanych populacji komórek, poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego oraz indukowała apoptozę w tych komórkach.
- Pentoksyfilina modulowała znacząco ekspresję, zarówno wybranych czynników badanego szlaku WNT, jak również genów docelowych dla działania jego produktów.
- Pentoksyfilina obniżała ekspresję MITF-M na poziomie mRNA i białka, co skutkowało zmniejszeniem częstości występowania komórek czerniaka o fenotypie MITF<sup>+</sup>/Melan-A<sup>+</sup> oraz obniżeniem poziomu ekspresji *TYR*.

Dyskusja jest napisana bardzo dojrzałe, a Doktorantka dokładnie analizuje uzyskane wyniki, na tle wyników podobnych badań wykonanych przez inne zespoły badawcze, oraz co bardzo istotne, wyjaśnia mechanizmy mogące leżeć u podstaw zaobserwowanych korelacji, choć zdają sobie sprawę, że nie było to łatwą sprawą, ze względu na to, iż uzyskane rezultaty badań są unikatowe w skali światowej.

W pracy znalazły się nieliczne błędy edytorskie, co na tak obszerną rozprawę (110 str.) jest godne podkreślenia.

W tym miejscu z obowiązku recenzenta przedstawiam uwagi dotyczące drobnych, nielicznych uchybień oraz własne sugestie:

- W pracy zabrakło informacji na temat zgody właściwej Komisji Bioetyki na przeprowadzenie badań, które były tematem doktoratu, chociaż znalazła się takowa w publikacjach, zawierających wyniki tej dysertacji.
- Moja drobna sugestia dotyczy również formułowania wniosków adekwatnych do postawionych celów. Z reguły przyjęte jest, że liczba wniosków powinna równać się liczbie celów pracy. Rozumiem, że na tak bardzo rozbudowane cele, jakie Autorka postawiła sobie w swojej pracy, trudno jest odpowiedzieć syntetycznymi wnioskami w tej samej liczbie, i dlatego w pracy tej pojawiły się one w zwiększonej liczności, z konieczności ich większej czytelności i zrozumiałości.
- Badania te są punktem wyjścia, który może pozwolić na zaproponowanie nowych związków chemicznych skutecznych w terapii przeciwnowotworowej. Nie należy jednak zapominać, że wykorzystany w pracy związek, wpływający na modyfikacje kanonicznego szlaku WNT w komórkach czerniaka, może także wpływać na te modyfikacje i regulację tego jak i innych szlaków biochemicznych w komórkach prawidłowych człowieka, co nie musi pozostawać bez negatywnej konsekwencji dla tych drugich. Dodatkowo (też moja drobna sugestia) te bardzo wartościowe, pionierskie badania powinny być poszerzone o prace dotyczące modelu *in vivo*

(modele zwierzęce), co pozwoliłoby na uzyskanie rzetelnego obrazu tego, jaki jest rzeczywisty efekt oddziaływania związek chemiczny-komórka. Badania tego typu powinny zostać przeprowadzone, w przypadku zamiaru wykorzystania pentoksyfiliny w przyszłościowej terapii przeciwnowotworowej.

Biorąc powyższą sugestię oraz to, że wyniki badań przedstawione w recenzowanej pracy doktorskiej należy uznać za oryginalne i istotne z punktu widzenia potencjalnej terapii czerniaka, chciałbym zadać pytanie: czy istnieje możliwość kontynuacji tych wartościowych badań w Zakładzie Biologii Molekularnej Nowotworów UMED, poszerzonych o inne związki pochodzenia naturalnego, które w połączeniu z określonym profilem molekularnym, genów docelowo regulowanych przez szlak WNT, w komórkach czerniaka, wyizolowanych od indywidulanego pacjenta, pozwoliłyby pomóc w zaproponowaniu terapii spersonalizowanej tego typu nowotworu?

Kierownik zespołu badawczego, Pani prof. dr. hab. Małgorzata Czyż, jest uznanym naukowcem o renomie międzynarodowej, zajmującym się, z sukcesami, tematyką biologii nowotworów, w tym czerniakami (choć nie tylko). Badania prowadzone pod kierownictwem Pani profesor charakteryzują się zawsze nowatorstwem, rzetelnością, dokładnością, pozwalającą zadbać o najmniejsze detale, a dowodem i potwierdzeniem tego jest to, że opublikowała Ona dużą liczbę znaczących prac, każdorazowo w prestiżowych czasopismach naukowych. Pani Profesor przekazuje, dodatkowo przy tym, swoją ogromną wiedzę i umiejętności, czego odzwierciedleniem jest wypromowanie przez Panią Profesor kilku młodych perspektywicznych badaczy. W opis ten jak najbardziej wpisuje się przedłożona do recenzji praca doktorska. W związku z tym myślę, że te zapoczątkowane przez zespół Pani Profesor, te bardzo istotne badania, powinny być kontynuowane, ze względu na to, że mogą przynieść wymierne efekty w postaci zrozumienia mechanizmu tej choroby, jak również proponowania nowych terapii czerniaka.

Te drobne uwagi, a właściwie sugestie, mają charakter roboczy i nie zmieniają mojej bardzo wysokiej oceny niniejszej dysertacji. Praca ta stanowi dobry przykład samodzielnego rozwiązania projektu badawczego, mogącego przynieść wymierne efekty praktyczne, w postaci tworzenia nowych kierunków terapeutycznych tego nowotworu.

Promotor dysertacji Pani prof. dr. hab. Małgorzata Czyż oraz Doktorantka są współtwórcami tej pracy, którą z pełnym przekonaniem można określić mianem sukcesu naukowego, zwłaszcza że uzyskane oryginalne wyniki są unikatowe w skali światowej. Potwierdzeniem mojej tezy jest to, że wyniki uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej zostały opublikowane w bardzo prestiżowych czasopismach naukowym z listy JCR, o znaczących współczynnikach oddziaływania (IF).

Dodatkowym, bardzo ważnym aspektem, podkreślających rangę przeprowadzonych badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej, jest ich finansowanie z grantów NCN oraz Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Uwzględniając idee i koncepcje badawcze oraz warsztat praktyczny zastosowany w pracy, z przyjemnością przedkładał do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr Beaty Talar do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz ze względu na nowatorski i nieprzeciętny charakter tej dysertacji, a także godny podziwu ogrom pracy włożonej w jej wykonanie, w tym niezwykłą staranność i dokładność, **wnioskuje o wyróżnienie** recenzowanej pracy doktorskiej.



dr hab. Tomasz Śliwiński prof. nadzw. UŁ