

Łódź, 04.08.2018 r.

dr hab. Renata Krupa  
Pracownia Genetyki Medycznej  
Uniwersytet Łódzki  
renata.krupa@biol.uni.lodz.pl  
tel. + 48 42 635 48 16

## **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**lek. med. Izabeli Zaleśnej**

**pt. „Zależność fenotypu komórek czerniaka w hodowlach *in vitro* od czynników wzrostu”**

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej Nowotworów Międzywydziałowej Katedry Chemii i Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. n.med. Małgorzaty Czyż.

Praca była finansowana ze źródeł Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu pt. „Eksperymentalny model nowej generacji do badań farmakologicznych czerniaka” pod kierownictwem promotora pracy prof. dr hab. Małgorzaty Czyż oraz z grantu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pt. „Analiza immunohistochemiczna fragmentów guzów pobranych od pacjentów”.

Pod względem formalnym praca jest napisana prawidłowo. Na stu dwudziestu trzech numerowanych stronach Doktorantka umieściła wstęp teoretyczny, założenia i cele pracy, materiał i metody, wyniki podzielone na część kliniczną i doświadczalną, dyskusję i wnioski. Oprócz tego w pracy znalazły się: spis treści, spis rycin, spis tabel, lista publikacji Autorki, lista komunikatów zjazdowych oraz streszczenia w językach polskim i angielskim. W moim odczuciu podrozdział „otrzymywanie linii komórkowych z materiału pooperacyjnego” mógłby znaleźć się w części pracy oznaczonej przez Doktorantkę jako doświadczalna. Pani Zaleśna umieściła w swojej pracy 11 rycin, 6 tabel oraz prawidłowo zacytowała 131 aktualnych pozycji literaturowych. Do pracy dołączono kopię uchwały Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi Numer RNN/84/09/KE z 17 marca 2009 r., zawierającej pozytywną opinię na temat prowadzonych badań z materiałem biologicznym pobranym od ludzi.

Pod względem językowym tekst pracy został zredagowany bardzo dobrze. Jest napisany zwięzłym stylem, w sposób przejrzysty i logiczny. Na szczególną uwagę zasługuje praktycznie bezbłędne zastosowanie przez Doktorantkę nomenklatury stosowanej w biologii i medycynie molekularnej. Praca zawiera drobne błędy edytorskie, np. nieprawidłowy sposób wyróżnienia akapitów.

W zawierającym osiem rozdziałów obszernym wstępie teoretycznym Autorka zamieściła dane dotyczące epidemiologii, czynników ryzyka, diagnostyki, leczenia i biologii molekularnej czerniaka.

W pierwszym rozdziale Pani Zaleśna charakteryzuje czynniki ryzyka czerniaka, podaje kryteria diagnostyczne oraz rokownicze, w oparciu o najnowsze osiągnięcia medycyny i biologii molekularnej. W rozdziale drugim krótko charakteryzuje postępowanie terapeutyczne z zastosowaniem chemioterapii oraz wyjaśnia w sposób syntetyczny molekularne podłoże immunoterapii czerniaka. Następne dwa rozdziały dotyczą zdarzeń molekularnych towarzyszących mutacjom genu *BRAF*, w tym transwersji T→A w pozycji 1799 odpowiedzialnej za powstanie fenotypu  $BRAF^{V600E}$  warunkującego konstytutywną aktywność szlaku sygnałowego RAS/RAF/MEK/ERK, prowadzącą w konsekwencji do braku kontroli wzrostu i zwiększenia zdolności przeżycia komórek czerniaka. Pozostałe rozdziały, oparte tak jak i poprzednie o najnowsze doniesienia literaturowe, dotyczą terapii czerniaka w oparciu o leki celowane. Przedstawiają również stan wiedzy i główne kierunki badań nad znaczeniem mikrośrodowiska dla rozwoju oporności komórek czerniaka. Tę część wstępu teoretycznego można uznać za doskonale uzasadnienie podjęcia przedstawionych przez lek. med. Izabelę Zaleśną doświadczeń.

Reasumując, we wstępie teoretycznym Doktorantka dowiodła posiadania szerokiej, aktualnej wiedzy w dziedzinie nauk medycznych, pozwalającej zarówno na swobodną dyskusję związanych z poruszaną tematyką zagadnień, jak również na sformułowanie oryginalnej hipotezy badawczej oraz zaplanowanie i wykonanie wysokiej jakości prac eksperymentalnych.

Główną hipotezą, którą Doktorantka podjęła się zweryfikować było przypuszczenie, że obecność egzogennych czynników wzrostu bFGF, EGF i HGF w podłożu hodowlanym wpływa na zmianę fenotypu komórek czerniaka oraz ich odpowiedź na wemurafenib i trametinib. Wemurafenib i trametinib, inhibitory szlaku RAS/RAF/MEK/ERK są lekami nowej generacji stosowanymi w terapii celowanej czerniaka. Przypuszcza się, że obserwowana u dużej części pacjentów oporność na te leki może wynikać z wpływu mikrośrodowiska nowotworu realizowanego m.in. za pośrednictwem czynników wzrostu. Wobec powyższego podjęcie przez Doktorantkę przedstawionego tematu badawczego należy uznać za w pełni uzasadnione merytorycznie.

W celu weryfikacji hipotezy wyznaczono cztery trafnie sformułowane cele badawcze:

1. Pozyskanie komórek czerniaka do hodowli *in vitro* z materiału pobranego od pacjentów
2. Analiza efektów komórkowych indukowanych przez czynniki wzrostu bFGF, EGF i HGF stosowane samodzielnie i w skojarzeniu w sześciu wyizolowanych populacjach komórek czerniaka

3. Określenie wpływu czynników wzrostu na aktywność szlaku sygnałowego RAS/RAF/MEK/ERK oraz kanonicznego szlaku WNT w badanych populacjach komórek czerniaka poprzez pomiar aktywności białek efektorowych tych szlaków, tj. ERK1/2 i  $\beta$ -kateniny
4. Określenie wpływu czynników wzrostu na aktywność czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B w wyizolowanych populacjach komórek czerniaka poprzez pomiar fosforylacji podjednostki p65. Ocena wpływu czynników wzrostu na aktywność tego białka.

Wszystkie postawione cele badawcze zostały zrealizowane.

Badania zostały przeprowadzone w warunkach *in vitro* z zastosowaniem wyprowadzanych od pacjentów linii komórkowych czerniaka z BRAF<sup>V600E</sup>. Oceniono morfologię komórek oraz proliferację metodą obrazowania w czasie rzeczywistym. Poziom aktywności szlaków RAS/RAF/MEK/ERK oraz WNT określono przy pomocy techniki Western blot. Dobór metod badawczych jest adekwatny do postawionych celów i nie budzi zastrzeżeń. Przedstawione elementy dokumentacji fotograficznej doskonale ilustrują osiągnięte wyniki. Chcę zapytać Panią Zaleśną, jakie techniki zastosowano do ilościowej oceny rezultatów Western blot.

Wyniki, podzielone na część kliniczną oraz część doświadczalną, przedstawiono w sposób syntetyczny na dwudziestu pięciu stronach, w postaci opisowej oraz w postaci wykresów, fotografii oraz tabeli. Na stronie 79 Autorka analizuje wyniki dotyczące wpływu egzogennych czynników wzrostu na indukcję apoptozy, mierzoną poziomem pociętego białka PARP. W wierszu 10 czytamy: *„Takich zależności nie obserwowano dla linii DMBC12, gdzie ilość pociętego PARP, po inkubacji z lekami, w porównaniu do białka odnośnikowego  $\beta$ -aktyny była nieco mniejsza w podłożach z użyciem skojarzonych czynników wzrostu, natomiast nie różniła się w podłożach z czynnikami wzrostu stosowanymi pojedynczo.”* W moim odczuciu zdanie to pozostaje w sprzeczności z ostatnim zdaniem podsumowania, w którym Autorka stwierdza: *„Nie odnotowano istotnych różnic w ... indukcji apoptozy w zależności od obecności egzogennych czynników wzrostu”*. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie tej rozbieżności.

W oparciu o otrzymane wyniki sformułowano osiem wniosków, będących w rzeczywistości syntetycznym opisem otrzymanych rezultatów. Główny wniosek przedstawionej rozprawy doktorskiej Autorka zamieściła w dyskusji konstatując, że przeprowadzone doświadczenia negatywnie weryfikują postawioną hipotezę badawczą.

Przeprowadzona na jedenastu stronach dyskusja otrzymanych wyników jeszcze raz potwierdza doskonale przygotowanie teoretyczne Doktorantki oraz jej zdolność do wnikliwej analizy i interpretacji uzyskanych wyników.

Dorobek naukowy Doktorantki obejmuje sześć prac doświadczalnych w języku angielskim, opublikowanych w czasopismach z listy JCR o wysokim pięcioletnim współczynniku oddziaływania IF od 2,309 do 4,401 oraz jedną pracę przeglądową w języku

polskim, zamieszczoną w renomowanym czasopiśmie Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. Jest to dorobek znaczący, w porównaniu do innych doktorantów, ale nie dziwi między innymi ze względu na fakt, że rozwój naukowy Izabeli Zaleśnej odbywał się w Zakładzie Biologii Molekularnej Nowotworów Międzywydziałowej Katedry Chemii i Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pod opieką prof. dr hab. Małgorzaty Czyż, naukowiec o renomie międzynarodowej, uznanej specjalistki w dziedzinie biologii molekularnej nowotworów. Treści zawarte w dwóch z prac: I. Zalesna, M. Osrodek, M.L. Hartman, M. Rozanski, M. Sztiller-Sikorska, K. Niewinna, D. Nejc, M. Czyz, Exogenous growth factors bFGF, EGF and HGF do not influence viability and phenotype of <sup>V600E</sup>BRAF melanoma cells and their response to vemurafenib and trametinib *in vitro*, PLoS One, 12 (2017) e0183498 oraz I. Zalesna, M.L. Hartman, M. Czyz, Znaczenie mutacji BRAF dla progresji i terapii czerniaka, raka brodawkowego tarczycy i raka jelita grubego, Postępy Hig Med Dosw (Online), 70 (2016) 471-488, weszły w skład przedstawionej do oceny pracy doktorskiej. W obu tych pracach Izabela Zaleśna jest pierwszym autorem, co świadczy o Jej wiodącym udziale w realizowanym projekcie badawczym.

Biorąc pod uwagę ten fakt oraz przedstawioną mi do oceny dysertację mogę stwierdzić, że rozprawa doktorska lek. med. Izabeli Zaleśnej stanowi samodzielne rozwiązanie problemu badawczego i może być podstawą do ubiegania się o uzyskanie stopnia naukowego doktora.

#### **Podsumowanie**

Rozprawa doktorska lek. med. Izabeli Zaleśnej jest nowatorska i stanowi oryginalne, samodzielne rozwiązanie założonego zadania badawczego. Przedstawiona przez Doktorantkę praca świadczy o Jej szerokiej wiedzy ogólnej z dziedziny nauk medycznych, umiejętności analizy i syntezy wyników prac badawczych oraz źródeł literaturowych, znajomości nowoczesnych technik eksperymentalnych oraz umiejętności stawiania i weryfikacji hipotez. Dorobek publikacyjny (6 artykułów oryginalnych, jeden przeglądowy i 6 komunikatów zjazdowych na zjazdach krajowych i zagranicznych; sumaryczny 5-letni IF = 20,152; 212 punktów MNiSW) potwierdza wysoką aktywność naukową Doktorantki.

W mojej ocenie przedstawiona praca lek. med. Izabeli Zaleśnej spełnia formalne i merytoryczne warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z późniejszymi zmianami). W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. med. Izabeli Zaleśnej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoką wartość merytoryczną przedstawionej pracy, składam do Wysokiej Rady wniosek o jej wyróżnienie.

Z poważaniem

