

Recenzja rozprawy doktorskiej pani **Marty Ośrodek** pt. „*Rola tlenu i insuliny w odpowiedzi komórek czerniaka na leki celowane*”.

Przedmiotem pracy doktorskiej było scharakteryzowanie wpływu dwu ważnych czynników obecnych w mikrośrodowisku nowotworu, insuliny i tlenu, na odpowiedź komórek czerniaka na leki stosowane w terapii celowanej (vemurafenib i trametynib). Ważnym problemem ograniczającym skuteczność terapii celowanych jest oporność nabywana przez komórki nowotworowe w trakcie leczenia. Mechanizmy molekularne uczestniczące w tym zjawisku nie są dobrze poznane, również ze względu na ograniczenia modeli badawczych *in vitro* stosowanych w większości badań. Niedostatki naszej wiedzy o mechanizmach nabywania oporności przez komórki nowotworowe dotyczą również czynników obecnych w mikrośrodowisku guza. Z tego też względu oryginalny temat podjęty przez Doktorantkę dotyczy bardzo ważnego zagadnienia o potencjalnym znaczeniu praktycznym. Należy również zwrócić uwagę, że realizacja projektu doktorskiego została przeprowadzona m.in. w ramach trzech projektów badawczych, których kierownikiem była Doktorantka: projektu NCN ETIUDA („Rola tlenu i insuliny w odpowiedzi komórek czerniaka na leki celowane”), projektu NCN PRELUDIUM („Rola insuliny w odpowiedzi komórek czerniaka na leki celowane”) oraz projektu finansowanego przez uczelnię („Rola insuliny w odpowiedzi komórek czerniaka na leki celowane”). Stanowi to niezależne potwierdzenie wysokiej oryginalności i jakości naukowej tematu realizowanego przez Doktorantkę, świadcząc jednocześnie o jej bardzo dużej aktywności i samodzielności badawczej.

Rozprawa doktorska pani Marty Ośrodek ma formę zbioru opublikowanych powiązanych tematycznie artykułów naukowych, uzupełnionych wprowadzeniem (wstęp i cel pracy) i podsumowaniem (omówienie wyników oraz ich dyskusja), a także wymaganym streszczeniem (dostępne są również oświadczenia współautorów publikacji tworzących cykl). W skład cyklu wchodzi trzy publikacje (dwie doświadczalne i jedna przeglądowa) opublikowane w latach 2019-2021:

- [1] **Ośrodek M**, Hartman ML, Czyż M. Physiologically Relevant Oxygen Concentration (6% O₂) as an Important Component of the Microenvironment Impacting Melanoma Phenotype and Melanoma Response to Targeted Therapeutics In Vitro. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 27;20(17):4203. doi: 10.3390/ijms20174203.
- [2] **Ośrodek M**, Różański M, Czyż M. Insulin Reduces the Efficacy of Vemurafenib and Trametinib in Melanoma Cells. *Cancer Manag Res.* 2020 Aug 13;12:7231-7250. doi: 10.2147/CMAR.S263767.

[3] **Ośrodek M, Woźniak M.** Targeting Genome Stability in Melanoma-A New Approach to an Old Field. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 28;22(7):3485. doi: 10.3390/ijms22073485.

W publikacji [1] przedstawiono analizę wybranych elementów fenotypu komórek czerniaka hodowanych *in vitro* w trzech stężeniach tlenu: 21% (hiperoksja), 6% (normoksja) i 1% (hypoksja). Doświadczenia przeprowadzono na trzech różnych liniach komórkowych wyprowadzonych z guzów (2 linie z mutacją BRAF^{V600E} i jedna z mutacją HRAS^{Q61R}). Stwierdzono, że obniżone stężenie tlenu (do poziomu tzw. normoksji) wpływa na szereg funkcji komórek w porównaniu do fenotypu obserwowanego w warunkach „standardowej” dla modelu *in vitro* hiperoksji. Przykładowo, obniżenie stężenia tlenu do 6% skutkowało zwiększoną ekspresją genów uczestniczących w metabolizmie glukozy, zwiększało udział komórek z wysoką ekspresją NGFR czy zmniejszało udział komórek z wysoką ekspresją MITF (obserwowano jednak dużą heterogenność odpowiedzi zależną od linii komórkowej). Co istotne, stężenie tlenu miało także wpływ na odpowiedź komórek na wemurafenib (inhibitor kinazy BRAF^{V600E}) oraz trametynib (inhibitor kinaz MEK1/2). Chociaż kinazy docelowe były hamowane niezależnie od stężenia tlenu, odmienne były niektóre inne funkcje komórek traktowanych inhibitorami. Przykładowo, w obniżonym stężeniu tlenu komórki traktowane inhibitorami były bardziej odporne na indukcję apoptozy i w mniejszym stopniu miały zahamowaną ekspresję genu VEGF. Autorzy pracy konkludowali, że chociaż istnieje duża heterogenność fenotypu w badanych liniach czerniaka, to w warunkach normoksji wemurafenib i trametynib mogą być mniej skuteczne w indukcji mechanizmów komórkowych istotnych dla ich działania terapeutycznego (co może być jedną z przyczyn różnic między modelami *in vivo* i modelami *in vitro* ze standardową „hiperoksją”).

W publikacji [2] przedstawiono analizę wybranych cech fenotypu komórek czerniaka hodowanych *in vitro* bez insuliny i w obecności tego hormonu (doświadczenia przeprowadzono na pięciu różnych liniach komórkowych wyprowadzonych z guza; wszystkie z mutacją BRAF^{V600E}). Stwierdzono m.in., że insulina zwiększa udział komórek z wysoką ekspresją NGFR i wpływa na aktywność elementów składowych ścieżki PI3K/AKT (choć tu również obserwowano dużą zmienność między liniami komórkowymi). Kluczowe były jednak obserwacje dotyczące wpływu insuliny na odpowiedź komórek traktowanych wemurafenibem i trametynibem. Stwierdzono, że przy braku insuliny oba inhibitory wykazują znacznie silniejsze efekty cytostatyczne (redukcja liczby komórek w wysokim poziomie Ki67) i cytotoksyczne (aktywacja apoptozy). Ponadto, przy braku insuliny oba inhibitory w znacznie większym stopniu wpływały na mechanizmy związane z utrzymaniem integralności

genomu, w tym hamowanie ekspresji genów naprawy DNA i indukcję skupisk ufosforylowanego histonu H2A.X. Co ciekawe, przy braku insuliny wemurafenib i trametynib silniej zwiększały toksyczne działanie doksocykliny, czyli czynnika działającego poprzez indukcję uszkodzeń DNA. Dodatkowo, przy braku insuliny oba inhibitory w większym stopniu zaburzały homeostazę glutationu, czynnika chroniącego komórki przed stresem oksydacyjnym. W konkluzjach autorzy zaproponowali model, w którym insulina osłabia terapeutyczne działanie inhibitorów kinaz ścieżki RAS/RAF/MEK hamując zarówno ich aktywność pro-apoptotyczną jak i anty-proliferacyjną.

W publikacji przeglądowej [3] omówiono zależności między mechanizmami uczestniczącymi w uszkodzeniach/naprawie DNA i utrzymaniu integralności genomu, a mechanizmami wykorzystywanymi w terapii celowanej (inhibitory ścieżki RAS/RAF/MEK) oraz immunoterapii (z użyciem przeciwciał anty-CTLA-4 i anty-PD-1) czerniaka. Praca ta więc jest w pewnym stopniu *post-scriptum* do pracy [2], przedstawiającym szerszy kontekst dla jednej z ciekawszych obserwacji przedstawionych w tej publikacji doświadczalnej (tj. wpływu insuliny na interakcje między mechanizmami utrzymującymi integralność genomu a działaniem inhibitorów kinaz BRAF i MEK). Praca przeglądowa w uporządkowany i ciekawy sposób przedstawia mechanizmy mające potencjalne znaczenie dla opracowania i wdrożenia nowych kombinowanych strategii terapeutycznych czerniaka.

Wszystkie prace tworzące cykl zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (dwie prace w czasopiśmie z Q1 i jedna w czasopiśmie z Q3 w swoich dziedzinach; wszystkie 140 punktów MNiSW; łączny IF czasopism, w których opublikowano prace stanowiące rozprawę doktorską wynosi ok. 12). Praca [1] opublikowana w roku 2019 była do tej pory cytowana 7 razy, co świadczy o jej dobrym odbiorze. Wskaźniki te stanowią niezależne potwierdzenie wysokiej wartości merytorycznej badań stanowiących treść pracy doktorskiej Kandydatki. Należy również dodać, że Doktorantka jest współautorem czterech innych prac pełnotekstowych opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (łączny IF czasopism, w których opublikowano te prace to ponad 13,5). Wszystkie prace, których autorem i współautorem jest Doktorantka były do tej pory cytowane ponad 50 razy, a jej indeks H wynosi 5 (wg. ISI WoS, kwiecień 2021)

W przypadku rozprawy doktorskiej opartej o współautorski cykl publikacji istotnym elementem recenzji jest ocena indywidualnego udziału Doktoranta w publikacjach stanowiących rozprawę, którą można przeprowadzić na podstawie oświadczeń współautorów.

W przypadku obu publikacji doświadczalnych [1 i 2] Doktorantka jest pierwszym autorem (z trzech), który zgodnie z oświadczeniami był odpowiedzialny za eksperymentalną część pracy, tj. opracowanie modelu badawczego i przeprowadzeniu zdecydowanej większości analiz, a także (wraz z Promotorem) uczestniczył w przygotowaniu koncepcji badania, opracowaniu wyników i przygotowaniu manuskryptów. W przypadku publikacji przeglądowej [3] Doktorantka jest pierwszym autorem (z dwóch) odpowiedzialnym za przygotowanie „surowego” manuskryptu. Po analizie oświadczeń współautorów uznaję, że indywidualny wkład Doktorantki w prace wieloautorskie stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej spełnia kryteria określone w ustawie.

Uwagi krytyczne. Zadaniem recenzenta rozprawy doktorskiej opartej o cykl publikacji nie jest ponowne zrecenzowanie tych prac. Tym niemniej warto zwrócić uwagę na kilka elementów, które mogły być przedstawione w tych publikacjach w bardziej przekonujący sposób.

- 1) Doktorantka w kilku miejscach wspomina, że zarówno zmienione stężenie tlenu jak i brak/obecność insuliny wpływają na proliferację komórek czerniaka traktowanych inhibitorami kinazy ścieżki RAS/RAF/MEK. Jednak zarówno w pracy [1] jak i w pracy [2] brak przedstawienia wyniku doświadczenia, które wprost udokumentowało by ten efekt. Przedstawiony jest jedynie wpływ tych czynników na udział komórek z wysoką ekspresją Ki67.
- 2) W pracy [1] mowa jest o tym, że w poziom tlenu wpływa na zdolność inhibitorów do indukcji apoptozy. Szkoda jednak, że zostało to przedstawione w mało „ilościowy” sposób (analiza Western-blot fragmentów białka PARP) – pożądane byłoby udokumentowanie tego tak jak w przypadku analogicznego wpływu obecności insuliny (Fig. 3 w pracy [2]).
- 3) Z konkluzji przedstawionych w pracy [1] wynika, że wiarygodna analiza w modelu *in vitro* czynników mających wpływ na efekty wemurafenibu i trametynibu powinna być przeprowadzona w warunkach normoksji (np. 6%). Zasadne byłoby więc, aby model doświadczalny wykorzystany w pracy [2] uwzględniał takie stężenie tlenu. W opisie metod brak informacji o zastosowanym stężeniu tlenu, co sugeruje wykorzystanie jego normalnego stężenia w powietrzu (czyli warunki hiperoksji). Wymaga to wyjaśnienia i uzasadnienia.

Rozprawa doktorska w formie zbioru wcześniej opublikowanych prac ma zapewne szereg zalet, jednak w mojej opinii nie daje ona Kandydatowi pełnych możliwości wykazania się

mistrzowskim opanowaniem umiejętności samodzielnego formułowania myśli w języku ojczystym. Dlatego warto podkreślić, że teksty uzupełniające zbiór publikacji (streszczenie, wstęp, założenia pracy, omówienie i dyskusja wyników) zostały przygotowane przez Kandydatkę poprawnie, bez dostrzegalnych błędów merytorycznych czy językowych. Jako drobiazg o walorze anegdotycznym należy potraktować dwa odmienne rozwinięcia skrótu NHEJ: „niehomologiczne łączenie końców” (wykaz skrótów str. 10) oraz „łączenie niehomologicznych końców” (omówienie wyników, str. 31). Czy oznacza to to samo, a jeśli nie, to które rozwinięcie jest poprawne (i dlaczego)?

Podsumowanie. Recenzowana rozprawa doktorska składa się z cyklu publikacji o wysokiej wartości merytorycznej. Indywidualny udział Doktorantki w pracach tworzących rozprawę stanowi potwierdzenie jej wiedzy i umiejętności prowadzenia pracy naukowej. Na uwagę zasługuje duża samodzielność i aktywność w pozyskiwaniu środków na badania, oraz (w warstwie technicznej) sposób, w jaki Doktorantka poradziła sobie z problemem heterogenności linii komórkowych.

Wniosek końcowy:

W mojej opinii przedstawiona rozprawa doktorska pani Marty Ośrodek w pełni spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z tym wnoszę do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o kontynuowanie postępowania i nadanie pani Marcie Ośrodek stopnia doktora.

Jednocześnie, mając na względzie wysoką ocenę rozprawy i całokształtu aktywności naukowej Kandydatki, wnioskuję o rozważenie możliwości wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani Marty Ośrodek jeśli spełnione są wymagania formalne obowiązujące w tej kwestii w Jednostce nadającej stopień doktora.



5 maja 2021

prof. dr hab. Piotr Widłak
Narodowy Instytut Onkologii – PIB, o/Gliwice