

Szczecin, 7.05.2021

Prof. dr hab. Jolanta Tarasiuk
Instytut Biologii
Uniwersytet Szczeciński

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Marty Ośrodek pt. "Rola tlenu i insuliny w odpowiedzi komórek czerniaka na leki celowane *in vitro*"

Podłoże molekularne czerniaków należących do najbardziej agresywnych nowotworów i mechanizmy wykształcania przez nie lekooporności nie są w pełni poznane, co stwarza szereg problemów klinicznych dotyczących opracowania skutecznych metod określania ryzyka wystąpienia choroby, jej wczesnego diagnozowania oraz projektowania nowych strategii terapeutycznych.

Dlatego też uważam, że cel pracy doktorskiej Pani mgr Marty Ośrodek jest istotny nie tylko naukowo, ale również ma potencjalnie bardzo duże znaczenie kliniczne. Dotyczy on bowiem opracowania optymalnych warunków przeprowadzania badań *in vitro* do badania molekularnych mechanizmów rozwoju czerniaków i wstępnego testowania skuteczności projektowanych leków, tak aby odzwierciedlały one warunki fizjologiczne charakterystyczne dla pacjentów z czerniakiem, z często współtowarzyszącymi im zaburzeniami metabolicznymi prowadzącymi do hiperinsulinemii. Recenzowana praca doktorska została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej Nowotworów Katedry Chemii i Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Małgorzaty Czyż. Jest ona częścią kompleksowych badań prowadzonych przez Promotora rozprawy dotyczących biologii i terapii molekularnej czerniaków.

We „Wstępie” Autorka rozprawy przedstawiła w sposób zwięzły zidentyfikowane dotychczas przyczyny molekularne rozwoju czerniaków oraz problem wykształcania oporności na opracowywane leki celowane. Bardzo wartościowym elementem tego rozdziału jest przedstawienie wpływu fenotypu metabolicznego komórek czerniaka zależnego w istotnym stopniu od poziomu tlenu w mikrośrodowisku rozwijającego się nowotworu na efekt terapeutyczny stosowanych leków. Doktorantka omówiła też udział insuliny w aktywacji szlaków sygnalizacyjnych komórek i w oparciu o dane epidemiologiczne wskazała na jej

potencjalną rolę w rozwoju lekooporności czerniaków. Przedstawiła też krótko modele badawcze czerniaka stosowane w eksperymentach *in vitro* podkreślając konieczność optymalizacji warunków prowadzonych hodowli, tak aby jak najbardziej odzwierciedlały środowisko tych komórek w organizmie pacjentów onkologicznych. Ta część rozprawy świadczy o bardzo dobrej i szerokiej znajomości zagadnień bezpośrednio związanych z tematyką pracy doktorskiej. Chciałabym przy tym podkreślić znajomość najnowszej literatury, gdyż znacząca część cytowanych przez Doktorantkę pozycji pochodzi z okresu ostatnich 10 lat. Wśród nich znajdują się również prace najnowsze z lat 2015-2020. O bardzo dobrej znajomości biologii molekularnej czerniaków i stosowanych metodach ich leczenia oraz mechanizmach wykształcanej przez nie oporności, jak również o nowych strategiach terapii celowanej i immunoterapii tego nowotworu świadczy również praca przeglądowa opublikowana z dominującym udziałem Doktorantki (Osrodek M, Wozniak M. 2021 Targeting genome stability in melanoma – a new approach to an old field. *International Journal of Molecular Sciences* 22(7): 3485), która wchodzi w skład publikacji stanowiących podstawę ocenianej rozprawy.

Cel pracy oraz szczegółowe zadania badawcze zostały sformułowane w sposób jasny i nie budzący żadnych wątpliwości merytorycznych. Celem zasadniczym pracy doktorskiej Pani mgr Marty Osrodek było określenie wpływu dwóch istotnych składników mikrośrodowiska komórek czerniaka, tj. tlenu oraz insuliny, na rozwój tych komórek oraz na ich odpowiedź na dwa wybrane leki stosowane w terapii celowanej, tj. na wemurafenib i trametynib. Wyselekcjonowane do badań leki zostały właściwie przez Doktorantkę dobrane, gdyż hamują one aktywność onkogennego szlaku RAS/RAF/MEK, krytycznego w rozwoju i progresji czerniaka (wemurafenib jest selektywnym inhibitorem zmutowanej kinazy BRAF^{V600E}, natomiast trametynib jest lekiem hamującym aktywność kinaz MEK1/2). W badaniach zastosowano linie komórek czerniaka DMBC (ang. *Department of Molecular Biology of Cancer*) wyprowadzone z wykorzystaniem materiału pozyskanego z guzów pacjentów Kliniki Chirurgii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Materiał genetyczny wyizolowany z komórek linii DMBC został zsekwencjonowany oraz zbadany pod kątem mutacji w genach kodujących białka szlaku RAS/RAF/MEK. Na przeprowadzenie badań zrealizowanych w ramach pracy doktorskiej uzyskano zgodę Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (zgoda nr RNN/84/09/KE).

Opis materiałów i metod stosowanych w pracy jest wystarczający do interpretacji uzyskanych wyników, jak również do ewentualnego powtórzenia doświadczeń. W rozprawie przedstawiono też metody analiz statystycznych zastosowane w pracy. Stwierdzam, że

Doktorantka jest doświadczonym eksperymentatorem, bardzo dobrze znającym nowoczesne techniki badawcze z zakresu biologii molekularnej, biochemii i badań funkcjonalnych oraz obrazowych komórki. W pracy zastosowano m.in. reakcję łańcuchowej polimerazy z analizą produktu w czasie rzeczywistym do określania poziomu mRNA, technikę Western blotting do oznaczania ilości białek z uwzględnieniem statusu ich ufosforylowania, mikroskopię fluorescencyjną „time-lapse” do analizy proliferacji komórek, mikroskopię konfokalną do określania poziomu fosforylacji histonu H2AX, będącego markerem dwuniciowych pęknięć DNA oraz cytometrię przepływową (m.in. do określania poziomu Ki-67 będącego markerem proliferacji komórek oraz czynników MITF i NGFR odgrywających istotną rolę w rozwoju czerniaka, jak również do badania apoptotycznej śmierci komórek). W eksperymentach przeprowadzanych przez Doktorantkę stosowano też test biochemiczny polegający na określeniu aktywności fosfatazy kwaśnej do oceny żywotności komórek oraz metodę luminescencyjną do określenia poziomu glutationu.

Wyniki badań otrzymane przez Doktorantkę zostały bardzo dobrze udokumentowane i przedstawione na 15 rycinach i w 2 tabelach, zamieszczonych w oryginalnych pracach opublikowanych w języku angielskim, które wchodzą w skład prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Świadczą one o ogromie pracy włożonej w wykonanie badań eksperymentalnych i przedstawienie uzyskanych wyników w przejrzystej formie, pozwalającej na ich łatwe przestudiowanie. Mam jednak trzy uwagi szczegółowe dotyczące tej części ocenianej rozprawy: i. warto było zwrócić większą uwagę na uzasadnienie wyboru różnych linii komórkowych czerniaka do przeprowadzenia badań odpowiednio wpływu tlenu (tj. linii DMBC12 i DMBC28 posiadających mutację BRAF^{V600E} oraz linii DMBC17 wykazującej rzadką mutację HRAS^{Q61R}) i wpływu insuliny (tj. pięciu linii posiadających mutację BRAF^{V600E}: DMBC11, DMBC12, DMBC21, DMBC28 i DMBC29) na funkcjonowanie komórek tego nowotworu i ich odpowiedź na leki celowane; ii. badania przeprowadzone z udziałem wemurafenibu i trametynibu zostały wykonane punktowo przy dwóch stężeniach tych leków, różniących się częściowo pomiędzy sobą w obu typach eksperymentów (dla wemurafenibu: 5 μ M i 10 μ M vs. 2 μ M i 10 μ M, dla trametynibu: 30 nM i 50 nM vs. 10 nM i 50 nM odpowiednio w badaniach roli tlenu i insuliny na efekt ich działania na komórki czerniaka); wskazanym byłoby zatem bardziej szczegółowe przedstawienie zasady doboru tych stężeń do przeprowadzenia zaplanowanych eksperymentów; iii. dla potwierdzenia efektu wzmacniania aktywności cytotoksycznej doksorubicyny przez odpowiednio wemurafenib lub trametynib i znoszenia tego efektu w

obecności insuliny zalecanym byłoby przeprowadzenie stosownych analiz izobolograficznych dotyczących interakcji leków w układach dwuskładnikowych.

Do istotnych wyników uzyskanych przez Doktorantkę było wykazanie, że obniżenie stężenia tlenu do poziomu charakterystycznego dla tkanek obwodowych, w tym również dla większości czerniaków (6% O₂) prowadzi do znaczącego wzrostu ekspresji genów, których produkty białkowe są zaangażowane w transport i metabolizm glukozy oraz w stymulowanie procesu angiogenezy (m.in. genu *GLUT1* kodującego transporter glukozy 1 i genu *PDK1* kodującego kinazę dehydrogenazy pirogronianowej 1 oraz genu *VEGF* kodującego czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego) w komórkach czerniaka wszystkich zastosowanych linii, tj. DMBC12, DMBC17 i DMBC28. Autorka rozprawy wykazała natomiast różnorodną odpowiedź badanych komórek na zmiany poziomu tlenu (21%, 6% i 1% określanych w pracy odpowiednio jako hiperoksja, normoksja i hipoksja) dotyczącą modulacji poziomu MITF i NGFR, co świadczy o dużej heterogenności czerniaków. Do bardzo znaczących wyników uzyskanych przez Doktorantkę było również wykazanie, że mimo że badane leki celowane, tj. wemurafenib i trametynib skutecznie hamowały aktywność szlaku RAS/RAF/MEK zarówno w warunkach hiperoksji, normoksji, jak i hipoksji, to wpływ tych leków na poziom transkryptów *PDK1*, *VEGF* i *SLC7A11* oraz białek MITF i Ki-67 zależał silnie od stężenia tlenu i od zastosowanej linii komórkowej, co dowodzi dodatkowo dużej plastyczności komórek czerniaków i ich zróżnicowanej wrażliwości na terapię warunkowaną poziomem tlenu w mikrośrodku guza nowotworowego. Do bardzo znaczących wyników uzyskanych w ramach realizacji ocenianej pracy doktorskiej było wykazanie, że również insulina znacząco ogranicza skuteczność badanych leków celowanych, tj. wemurafenibu i trametynibu, mimo braku jej wpływu na aktywność szlaku RAS/RAF/MEK. Efekt ten stwierdzono w komórkach wszystkich badanych linii czerniaka DMBCs. Jednocześnie Doktorantka wykazała, że pomimo znacznych różnic w fenotypie komórek czerniaka wykorzystywanych linii (DMBC11, DMBC12, DMBC21, DMBC28 i DMBC29) dotyczących aktywności silnie proprzeżyciowego szlaku PI3K/AKT, insulina hamowała efekt antyproliferacyjny wemurafenibu i trametynibu, zmniejszała ich zdolność do zaburzania procesów naprawy DNA oraz ograniczała apoptozę indukowaną tymi lekami celowanymi w przypadku wszystkich badanych linii komórek czerniaka. Ważnym wynikiem uzyskanym przez Doktorantkę było również wykazanie, że obecność insuliny prowadzi do ograniczenia skuteczności wemurafenibu i trametynibu do wywoływania stresu oksydacyjnego komórek czerniaka związanego m.in. z obniżeniem ich zdolności do zmniejszenia ekspresji genu *SLC7A11* kodującego antyporter cystynowo-glutaminianowy i *SLC1A5* kodującego

transporter glutaminy, tj. dwa kluczowe białka, które dostarczają substraty do produkcji glutationu GSH uczestniczącego w odpowiedzi antyoksydacyjnej komórek. Do bardzo znaczących wyników uzyskanych przez Doktorantkę należy również wykazanie wpływu insuliny na wzrost subpopulacji komórek o wysokim poziomie NGFR, tj. czynnika uważanego za marker komórek macierzystych czerniaka o najmniejszej wrażliwości na leki celowane wynikającej ze zwiększonej stabilności genomu tych komórek i wykształconych mechanizmów oporności na uszkodzenia DNA.

Ostrożnie przeprowadzona dyskusja uzyskanych wyników na tle wyników innych autorów świadczy o dużej wiedzy nabytej przez Panią mgr Martę Ośrodek z zakresu biologii molekularnej, biochemii i projektowania innowacyjnych strategii terapeutycznych oraz o odpowiedzialności badawczej Doktorantki. Bardzo wartościową częścią tego rozdziału jest również wskazanie przyczyn obserwowanych rozbieżności pomiędzy wynikami testowania projektowanych leków z wykorzystaniem modeli komórkowych i wynikami uzyskiwanymi w fazie badań klinicznych, które są związane w istotnym stopniu z brakiem uwzględniania w badaniach prowadzonych w układach *in vitro* roli tlenu i insuliny, należących do istotnych składników mikrośrodowiska czerniaków.

W końcowej części rozprawy doktorskiej Autorka dokonała podsumowania uzyskanych wyników. Syntetyczny sposób ich przedstawienia świadczy o dojrzałości badawczej Doktorantki. Cennym jest również wskazanie przez Autorkę rozprawy perspektyw dalszych badań dotyczących m.in. oceny klinicznej wpływu wysokiego poziomu insuliny na skuteczność celowanej terapii przeciwnowotworowej stosowanej u pacjentów z czerniakiem.

Rozprawa została zredagowana w sposób przejrzysty i poprawny stylistycznie. Jest też zasadniczo napisana poprawnym językiem naukowym, chociaż Autorce nie udało się uniknąć pewnych nieścisłości nomenklaturowych i merytorycznych oraz niezręcznych sformułowań, m.in.: i. „PTEN – fosfataza kinazy PI3K”; ii. „fosforylacja oksydacyjna pirogronianu”; iii. „przemiana glukozy w łańcuchu oddechowym”. Doktorantka w kilku miejscach ocenianej rozprawy dosyć dowolnie używa też określeń „ekspresja genu” i „ekspresja białka”, co nieco utrudnia śledzenie omawianych przez nią wyników, zważywszy dodatkowo na fakt, że nie zawsze stosuje przyjętą w literaturze naukowej zasadę, żeby nazwę genu podawać kursywą, a nazwę białka z zastosowaniem zwykłej czcionki (wskazany byłoby stosowanie w pracy określeń „ekspresja genu”, a w przypadku białka, będącego produktem ekspresji genu – „poziom białka”). Właściwszą również od zastosowanej w rozprawie pełnej nazwy skrótu RTK: „receptory czynników wzrostu” jest nazwa: „receptorowa kinaza tyrozynowa”, bądź „receptorowe kinazy tyrozynowe” w przypadku zastosowania skrótu RKTs. W sporządzonym

przez Doktorantkę wykazie literatury nie zamieszczono też publikacji *Suleymanova i wsp., 2017*, cytowanej w tekście rozdziału „Wstęp” recenzowanej pracy. Te drobne uwagi wymienione powyżej nie rzutują jednak na moją bardzo wysoką ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji ocenianego doktoratu i zamieszczone w recenzowanej rozprawie zostały opublikowane w postaci 2 prac doświadczalnych w czasopismach z listy filadelfijskiej: *International Journal of Molecular Sciences* (IF – 4,556; MEiN – 140) i *Cancer Management and Research* (IF – 2,886; MEiN – 140). Do publikacji stanowiących podstawę ocenianej rozprawy doktorskiej należy też praca przeglądowa, która ukazała się w *International Journal of Molecular Sciences* (IF – 4,556; MEiN – 140). Przytoczone wartości IF i punktacja MEiN wskazują na bardzo wysoki poziom naukowy publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej. We wszystkich tych trzech pracach Pani mgr Marta Ośrodek jest pierwszym autorem. Załączone oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy potwierdzają ważną rolę koncepcyjną i dominujący udział doświadczalny Doktorantki w przeprowadzanych badaniach eksperymentalnych i w przygotowaniu pracy przeglądowej.

Całościowy dorobek naukowy Pani mgr Marty Ośrodek mieści się w obszarze nauk medycznych i dotyczy terapii molekularnej czerniaków. Liczy on ogółem 7 publikacji (łącznie IF – 25,767; punkty MEiN – 820), z czego na dorobek poza rozprawą doktorską składają się 4 kilkuautorskie oryginalne prace eksperymentalne (łącznie IF – 13,769; punkty MEiN – 400). Wprawdzie w przypadku dodatkowych prac, które nie wchodzą w skład ocenianej rozprawy Doktorantka nie należy do autorów wiodących, jednak dorobek ten świadczy o jej dużej aktywności oraz umiejętności pracy w większych zespołach badawczych. O dużej aktywności naukowej Doktorantki świadczy również jej udział w licznych konferencjach naukowych, głównie o zasięgu międzynarodowym. Doktorantka jest współautorem łącznie 6 komunikatów zjazdowych, z czego w 4 z nich jest pierwszym autorem.

W podsumowaniu oceny pracy stwierdzam, że jest ona znaczącym osiągnięciem naukowym Doktorantki i jej Promotora zrealizowanym z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych. Przedstawione w rozprawie wyniki, dotyczące roli tlenu i insuliny w odpowiedzi komórek czerniaka na leki celowane, są oryginalne i bardzo wartościowe zarówno pod względem poznawczym, jak również aplikacyjnym i mogą stanowić ważny punkt wyjścia do dalszych badań. Oceniana rozprawa świadczy również o dużej wiedzy Doktorantki w zakresie biologii molekularnej czerniaków oraz innowacyjnych strategii ich leczenia z wykorzystaniem chemioterapii celowanej i metod immunoterapeutycznych.

Dowodzi także opanowania przez nią bogatego warsztatu metodycznego i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz rozwiązywania oryginalnych problemów naukowych.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Stwierdzam też, że zdobyta przez Doktorantkę ogólna wiedza teoretyczna oraz osiągnięcia naukowe przedstawione w rozprawie uzasadniają nadanie jej stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauk medycznych. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr Marty Ośrodek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na wysoki poziom metodyczny i naukowy recenzowanej rozprawy doktorskiej, ogrom włożonej pracy, jak również duże potencjalnie znaczenie aplikacyjne uzyskanych wyników, przedkładam Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Prof. dr hab. Jolanta Tarasiuk