



Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Medycznych
Instytut Nauk Medycznych

Dr hab. n. med. Anna Żaczek, prof. UR

Recenzja pracy doktorskiej mgr Pauliny Kopy-Stojak

pt. „Analiza mechanizmu uwrażliwiania komórek nowotworowych na cytostatyki za pomocą inhibitorów naprawy pęknięć dwuniciowych DNA”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje cykl trzech powiązanych tematycznie publikacji o łącznej punktacji IF = 5,826, których Doktorantka jest pierwszym autorem. Rozprawę otwierają informacje dotyczące źródła finansowania (OPUS, Grant NCN) oraz podsumowanie dotychczasowego dorobku naukowego Doktorantki. Poza pracami wchodzącymi w skład rozprawy dorobek naukowy stanowi 7 dodatkowych publikacji oraz dwie prezentacje plakatowe przedstawione na zagranicznej konferencji naukowej. Całość zamykają oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej dotyczące ich wkładu pracy w powstanie poszczególnych publikacji. Nie ma wątpliwości, że wkład pracy mgr Pauliny Kopy-Stojak był dominujący w każdej publikacji składającej się na ocenianą rozprawę. Doktorantka jest też pierwszym autorem pięciu z 7 prac wymienionych jako dorobek naukowy. Fakt, że wszystkie prace łączy jeden problem badawczy a całociowy IF dorobku naukowego Doktorantki wynosi 20,675 świadczy o Jej dojrzałości naukowej a przedłożona do recenzji dysertacja ma zwieńczyć ten etap kariery naukowej tytułem doktora.

Skoro wyniki będące przedmiotem rozprawy są już opublikowane moje zadanie jako recenzenta było znacznie ułatwione bowiem wyniki podlegały uprzednio ocenie przez recenzentów czasopism. Praca doktorska, przedstawiona w dwóch wersjach językowych, obejmuje: wstęp, cele, materiały i metody, opis wyników, podsumowanie oraz wnioski i publikacje będące integralną częścią rozprawy. Opracowana rozprawa zawiera także dwie bardzo pomocne ryciny. Jedna z rycin przedstawia schemat doświadczeń przeprowadzonych w celu realizacji tematu, natomiast druga rycina przedstawia mechanizm działania analizowanych w ramach rozprawy inhibitorów naprawy DNA (NU7441 i SCR7). Stanowi to

dotkliwe ułatwienie i wprowadzenie do tematu przed lekturą publikacji oryginalnych. Zamieszczone streszczenie pracy jest rozprawą doktorską w wersji zminimalizowanej.

Sprawne systemy naprawy błędów i uszkodzeń DNA oraz ich interakcja z procesami komórkowymi strzegą integralności i stabilności genomu chroniąc przed pojawieniem się chorób genetycznych, w tym chorób nowotworowych. Uszkodzenie procesów naprawczych stanowi poważne zagrożenie i zwiększa podatność komórek na rozwój nowotworów. Z drugiej strony, uszkodzenie procesów naprawczych zwiększa efektywność terapii przeciwnowotworowych. Stosowane w terapii specyficzne chemioterapeutyki, takie jak związki platyny czy inhibitory topoizomerazy, generują w szybko dzielących się komórkach nowotworowych powstawanie pęknięć dwuniciowych DNA (DSB), najbardziej cytotoksycznych form uszkodzeń DNA. Niestety, komórki nowotworowe mogą nabywać oporność na takie terapie poprzez podwyższenie efektywności naprawy DSB, co osłabia efekt chemioterapii i prowadzi do progresji choroby. Głównym szlakiem naprawy DSB w komórkach ssaków, obok wiernej naprawy na drodze rekombinacji homologicznej, jest podatna na błędy naprawa przez niehomologiczne łączenie końców (NHEJ). Blokowanie naprawy uszkodzeń poprzez stosowanie specyficznych inhibitorów NHEJ jest obiecującym kierunkiem badań nad uwrażliwieniem komórek nowotworowych na stosowane chemioterapeutyki.

Poglądowa publikacja wchodząca w skład rozprawy doktorskiej, opublikowana w *Current Medicinal Chemistry 2018* o wysokim współczynniku wpływu IF 3,894, stanowi przegląd aktualnego stanu wiedzy dotyczącego inhibitorów napraw pęknięć dwuniciowych DNA. Struktura publikacji jest typowa dla prac przeglądowych, rozdziały i podrozdziały zatytułowane są według merytorycznej treści. Zacytowanie 120 pozycji literatury światowej świadczy o wyczerpującym zgłębieniu tematu i dużej wiedzy Doktorantki. Publikacja, co charakterystyczne dla prac tego typu, stanowi również przegląd aktualnie prowadzonych badań nad inhibitorami napraw, a kończy się konkluzją na temat konieczności dalszych badań i wskazuje na przyszłe kierunki badawcze. **Proszę Doktorantkę o krótką charakterystykę obiecujących kierunków badawczych, szczególnie tych opartych o wykorzystanie nanocząstek dla dostarczania inhibitorów naprawy do komórek oraz badań związanych z tzw. syntetyczną letalnością.**

Badania znanych inhibitorów naprawy DSB, uzasadnione są ich synergistycznym działaniem w połączeniu z lekami uszkadzającymi DNA aby zwiększyć potencjał kliniczny terapii. Cele rozprawy, precyzyjnie przez Autorkę określone, wpisują się w ten kierunek badań, a ich osiągnięcie udowodnione zostało w dwóch publikacjach eksperymentalnych opublikowanych w *Molecular Biology Reports*, odpowiednio w 2020 i 2021 roku. Dwa wyznaczone cele dysertacji to:

1. Ocena efektu terapeutycznego inhibitorów naprawy DSB w terapii kombinowanej z cytostatykami oraz
2. Identyfikacja mechanizmu uwrażliwiania komórek nowotworowych na cytostatyki za pomocą inhibitorów naprawy DSB.

Aby zrealizować te cele Doktorantka określiła wskaźnik kombinacji stosowanych leków oraz wpływ badanych inhibitorów DSB na cyto- i genotoksyczność, na wydajność naprawy DSB, modulację cyklu komórkowego oraz indukcję apoptozy. Nie mam żadnych zastrzeżeń dotyczących zastosowanych metod i technik badawczych, świadczą one o opanowaniu przez Doktorantkę bogatego warsztatu metodycznego.

Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem trzech modeli komórkowych: dwóch linii komórkowych glejaka wielopostaciowego (z aktywną i nieaktywną kinazą DNA-PK) oraz linię gruczolaka jelita grubego (LoVo). **Ciekawi mnie jakie było kryterium wyboru linii komórkowych do przeprowadzenia badań. Czy zasadnym nie byłoby zastosowanie także komórek prawidłowych lub czy znane jest działanie badanych inhibitorów NHEJ (NU7441 i SCR7) na komórki prawidłowe?**

Uzyskane wyniki sprowadzić można do konkluzji, że zastosowanie dwóch inhibitorów topoizomerazy, etopozydu i NK314 na komórki glejaka wielopostaciowego daje obiecujący efekt terapeutyczny, a inhibitor napraw pęknięć dwuniciowych NU7441 uwrażliwia komórki nowotworowe na te leki wywołując efekt synergii. Ponadto, NU7441, a także inny inhibitor systemu NHEJ, SCR7, uwrażliwiają komórki gruczolaka jelita grubego (LoVo) na cisplatynę i etopozyd zarówno w monoterapii jak i w ich połączeniu choć w różnym stopniu. Doktorantka wykazała również, że mechanizm uwrażliwienia komórek nowotworowych przez inhibitory napraw polega na: indukcji uszkodzeń DNA, spowolnieniu naprawy DNA (czyli akumulacji DSB), modulacji cyklu komórkowego i indukcji apoptozy. Co prawda Doktorantce nie udało się wykazać tej indukcji w przypadku komórek glejaka ale wykazała, że NU7441 stymulował apoptozę w komórkach gruczolaka jelita grubego poddanych działaniu etopozydu i cisplatyny. Doniesienia literaturowe także wskazują, że NU7441 w połączeniu z inhibitorami topoizomerazy indukował apoptozę np. z amrubicyną ATM oraz irynotekaniem CPT-11 w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc (*Yanai M. i wsp., 2017*). Zgadzam się ze stwierdzeniem, że wpływ NU7441 może zależeć od zastosowanej dawki lub od rodzaju nowotworu. **Stąd moje pytanie - czym kierowała się Doktorantka przy wyborze, wydaje się, że najwyższej ze stosowanych w dostępnych publikacjach, dawki inhibitora NU7441 do swoich eksperymentów?**

W podsumowaniu (str. 13) Doktorantka pisze „leczenie skojarzone (...) jest skuteczne wyłącznie, jeżeli zastosowane preparaty działają w sposób synergistyczny”. **Czy stwierdzenie**

to nie jest to zbyt kategoryczne? Oczywiście, że w leczeniu skojarzonym chodzi o wzmocnienie efektu terapeutycznego ale inne korzyści mogą dotyczyć np. zmniejszenia działań niepożądanych oraz opóźnienia lub zapobiegania lekooporności. Znane są działania addytywne leków np. tamoksyfen stosowany w leczeniu raka piersi w połączeniu z innymi lekami działa czasem synergistycznie a czasem „tylko” addytywnie (*Frei E, Eder JP, 2003*).

W związku z rozwojem medycyny spersonalizowanej chciałabym zadać Doktorantce pytanie czy któreś ze stosowanych w ramach rozprawy doktorskiej metod badawczych mogłyby w przyszłości znaleźć praktyczne zastosowanie jako badanie prognostyczne w celu wyboru optymalnej terapii?

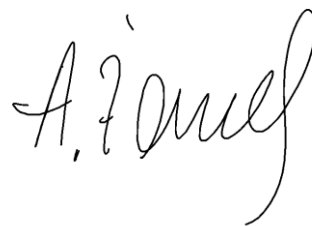
Doktorantka nie ustrzegła się w swojej pracy drobnych błędów edycyjnych, które z obowiązku recenzenta wymieniam:

- na 13 stronie rozprawy, pisząc o efekcie cytotoksycznym inhibitorów w przypadku terapii etopozydem, Autorka wymienia 2 inhibitory: NU7221 oraz SCR7, tymczasem inhibitory będące przedmiotem badań to NU7441 i SCR7,
- na str. 21 rozprawy, pozycja 34 cytowanej literatury zawiera dwukrotnie powtórzone nazwiska trzech autorów; również w publikacji w *Mol Biol Rep* 2021, w spisie literatury na poz. 17 powtórzone jest nazwisko pierwszego autora;
- spis bibliografii na stronach 18-22 obejmuje miesiąc i rok publikacji a czasem również i dzień, sądzę, że wskazane byłoby ujednoczenie podawanych dat; natomiast pozycja 27 cytowanej literatury nie ma podanego roku publikacji ani w wersji polskiej na str. 20 ani w wersji angielskiej na stronie 37,
- w polskim spisie bibliografii jedna pozycja literaturowa podana jest dwukrotnie – poz. 20 i 28 (str. 20), brak natomiast pozycji *Hammond i wsp., 2014*, która cytowana jest w wersji angielskiej na poz. 31, skutkuje to tym, że 4 pozycje literaturowe w spisie polskim i angielskim się różnią, trzeba jednak zaznaczyć, że w tekście cytowane są poprawnie,
- na stronie 17 skrót HRR oznacza naprawę przez rekombinację homologiczną a nie rekombinację homologiczną (HR),
- w publikacji w *Mol Biol Rep* 2021, w rozdziale Wyniki, rycina Fig. 1C opisana jest jako przedstawiająca przeżywalność komórek po zastosowaniu kombinacji leków, tymczasem kombinację VP-16+CDDP przedstawia Fig. 1D,
- Fig.3 z publikacji w *Mol Biol Rep* 2020 nie ma oznaczeń A i B pomimo, że w jej opisie są użyte; warto byłoby też używać jednakowych wielkości liter dla oznaczeń w tekście i na rycinach,
- brak w rozprawie tabel stanowiących dodatek do publikacji w *Mol Biol Rep* 2020, dołączona dyskietka coraz częściej stanowi kłopot z odczytaniem; może alternatywą mogłoby być umieszczenie danych w chmurze i dołączenie linku?

Powyższe niedociągnięcia nie umniejszają wartości przedłożonej rozprawy, 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 stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Pauliny Kopy-Stojak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na rangę podjętego problemu i wysoką wartość poznawczą uzyskanych wyników i imponujący dorobek naukowy Doktorantki, wnoszę o wyróżnienie tej pracy stosowną nagrodą.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Żaczek', written in a cursive style.

Rzeszów, 20 lipca 2022

Dr hab. n. med. Anna Żaczek, prof. UR