



Łódź, 22 lipca 2022

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek  
Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium  
Instytut Biologii Medycznej PAN

**Ocena pracy doktorskiej mgr Pauliny Kopa-Stojak pt. „Analiza mechanizmu uwrażliwiania komórek nowotworowych na cytostatyki za pomocą inhibitorów naprawy pęknięć dwuniciowych DNA”.**

Przyszłość leczenia nowotworów oparta będzie prawdopodobnie o terapie celowane z zastosowaniem terapii biologicznych. Obecnie jednak, chemioterapia jest wciąż najczęściej stosowaną metodą ogólnoustrojową w leczeniu nowotworów. Polega ona na podawaniu pacjentowi substancji cytostatycznych, zaburzających cykl komórkowy i prowadzących do śmierci komórki lub zahamowania jej rozwoju i podziałów, które nie działają jednak wybiórczo na nowotwór, lecz są aktywne wobec wszystkich komórek szybko się dzielących, w tym komórek nabłonka układu pokarmowego, gonad czy szpiku kostnego. W celu zwiększenia skuteczności leczenia zwykle pacjentowi podaje się kilka leków z różnych grup cytostatyków w tym leki alkilujące, inhibitory mitozy, inhibitory topoizomerazy I i II, antybiotyki o działaniu cytostatycznym czy antymetabolity. Poważną przeszkodą w procesie leczenia jest pojawiająca się lekooporność komórek nowotworowych o podłożu kinetycznym, biochemicznym czy farmakologicznym. W przypadku oporności biochemicznej przyczyną może być m.in. brak aktywacji lub nasilona inaktywacja leku, aktywne usuwanie leku z komórki, czy nasilona naprawa DNA. Właśnie z tym ostatnim zjawiskiem postanowiła zmierzyć się Doktorantka badając możliwości jednoczesnego zastosowania wybranych cytostatyków prowadzących do akumulacji w komórce dwuniciowych pęknięć DNA oraz inhibitorów procesu łączenia niehomologicznych końców DNA (NHEJ). Modelem badawczym Doktorantki były linie nowotworowe glejaka wielopostaciowego oraz gruczolakoraka jelita grubego. Z punktu widzenia zdrowia publicznego, konieczności wprowadzania nowych schematów leczenia u pacjentów onkologicznych, oraz na podstawie aktualnej literatury naukowej, tematykę pracy



Doktorantki uważam za niezwykle aktualną i ważną. Recenzowana praca została wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego pod opieką prof. dr hab. Tomasza Popławskiego co zapewniło Doktorantce dostęp do niezbędnych dla wykonywanej pracy materiałów i technik badawczych.

Dysertacja została przygotowana na podstawie jednej pracy pogładowej oraz dwóch współautorskich prac eksperymentalnych, w których Doktorantka pełniła wiodącą rolę, opublikowanych w czasopismach naukowych z listy Filadelfijskiej. Udział Doktorantki w przygotowaniu opublikowanych prac został szczegółowo opisany oraz potwierdzony poprzez oświadczenia współautorów. Załączone publikacje zostały poprzedzone streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim, krótkim wstępem literaturowym oraz opisem najważniejszych wyników wraz z podsumowaniem.

Jako obszerne wprowadzenie do tematyki badań należy uznać pracę pogładową Doktorantki zamieszczoną w *Current Medical Chemistry*. W publikacji tej autorzy przeprowadzają charakterystykę inhibitorów systemu naprawy dwuniciowych pęknięć DNA w aspekcie ich potencjalnego znaczenia jako nowych leków przeciwnowotworowych. Praca ta zawiera krótki opis procesu indukcji i naprawy dwuniciowych pęknięć DNA z wykorzystaniem procesu homologicznej rekombinacji oraz łączenia niehomologicznych końców DNA. W drugiej części pracy autorzy skupiają się na białkach zaangażowanych w obu procesach i ich inhibitorach dyskutując możliwość ich zastosowania w terapii.

W pierwszej z dwóch publikacji eksperymentalnych będących podstawą pracy doktorskiej, opublikowanej w *Mol. Biol. Rep.*, Doktorantka badała możliwość zastosowania inhibitora Topo2 $\beta$  (etopozydu), Topo2 $\alpha$  (NK314), oraz inhibitora DNA-PK (NU7441) na linii komórkowej glejaka wielopostaciowego. Bardzo interesującym podejściem metodycznym było zastosowanie w badaniach dwóch linii różniących się zdolnością do ekspresji kluczowego białka systemu naprawy NHEJ, DNA-PK. Efekt stosowania cytostatyków oraz inhibitora DNA-PK Doktorantka badała poprzez pomiar cytotoksyczności, genotoksyczności i wydajności naprawy z zastosowaniem alkalicznej wersji testu kometowego, analizę modulacji faz cyklu komórkowego oraz mechanizmu śmierci komórkowej z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Doktorantka zaobserwowała synergistyczny efekt redukcji proliferacji badanych linii komórkowych związany ze zwiększoną akumulacją dwuniciowych pęknięć DNA, zaburzeniem cyklu komórkowego oraz indukcją apoptozy w przypadku zastosowania obu inhibitorów topoizomeraz. Zastosowanie





inhibitora DNA-PK z jednym lub oboma cytostatykami spowodowało wzmocnienie efektu obserwowanego na komórkach obu linii w tym zwiększenie poziomu uszkodzeń DNA. Intuicyjnie, ze względu na fakt, że NU7441 jest inhibitorem DNA-PK a linie M059K i M059J różnią się zdolnością do syntezy DNA-PK, spodziewałbym się przy zastosowaniu etopozydu lub NK314 oraz NU7441 synergistycznego efektu wyłącznie dla linii typu dzikiego. Brak syntezy białka DNA-PK w linii M059J, będącego tarczą molekularną dla NU7441, powinien spowodować brak odpowiedzi komórek tej linii na zastosowany inhibitor. **Czy Doktorantka mogłaby wytłumaczyć w tym aspekcie uzyskany przez siebie wynik synergii obserwowane dla obu linii i zaproponować molekularny mechanizm tłumaczący to zjawisko?**

W drugiej z eksperymentalnych publikacji będących podstawą pracy doktorskiej, opublikowanej również w Mol. Biol. Rep., Doktorantka badała możliwość zastosowania leczenia skojarzonego cisplatyną oraz etopozydem w obecności inhibitorów NHEJ (NU7441, SCR7) na uwrażliwienie komórek gruczolaka jelita grubego. Również w tym przypadku, zgodnie z postawioną hipotezą badawczą, Doktorantka zaobserwowała synergistyczny efekt zastosowania inhibitorów DNA-PK oraz ligazy IV wzmacniający cytotoksyczność wywołaną obecnością cisplatyny i etopozydu. Inhibitory NHEJ zwiększały także poziom dwuniciowych pęknięć DNA w obecności cisplatyny i etopozydu.

W obu zastosowanych modelach badawczych Doktorantka wykazała, że użycie inhibitora DNA-PK wpływa na wzrost cytotoksyczności terapii skojarzonej z zastosowaniem inhibitorów topoizomerazy lub z zastosowaniem cisplatyny z obserwowaną akumulacją dwuniciowych pęknięć DNA.

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz dostępnej literatury Doktorantka wnioskuje, że zastosowanie kombinacji dwóch inhibitorów topoizomerazy, być może wraz z inhibitorami napraw DNA, stanowi potencjalnie obiecujący schemat leczenia glejaka wielopostaciowego.

Opis uzyskanych wyników wraz z dyskusją, jak i dyskusja zawarta w załączonych publikacjach, wskazują na dużą dojrzałość Doktorantki, znakomitą znajomość tematu i zdolność do krytycznego odnoszenia się do uzyskanych przez siebie wyników przez pryzmat danych literaturowych.

Proszę Doktorantkę o odniesienie się podczas publicznej obrony do poniżej postawionych pytań.



- Proszę Doktorantkę o krótkie scharakteryzowanie podczas publicznej obrony mechanizmów nabywania oporności przez komórki nowotworowe na leczenie. Które z tych mechanizmów dominują u pacjentów z nowotworami mózgu oraz jelita grubego?
- Czy prowadzono badania kliniczne z zastosowaniem w schemacie leczenia chorób nowotworowych inhibitorów naprawy DNA wspomagających proces leczenia?
- Czy biorąc pod uwagę efekt inhibitorów naprawy DNA na komórki zdrowe, w przypadku terapii skojarzonej zawierającej inhibitory naprawy DNA, nie ma niebezpieczeństwa generowania dodatkowych ognisk nowotworzenia poprzez zwiększoną częstość mutacji czy też do powikłań w postaci wtórnej białaczki?

**Podsumowanie:**

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą dokorską Pani Pauliny Kopa-Stojak uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera oryginalne i bardzo wartościowe wyniki i spełnia wszystkie kryteria zawarte w ustawie z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. 2017, poz. 1789, art. 13). Wnoszę do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani Pauliny Kopa-Stojak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik  
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

  
Prof. dr hab. Jarosław Dziadek