

dr hab. Marta Kopaczyńska, Prof. ucz.
Katedra Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
Politechnika Wroclawska
50-370 Wrocław, Wybrzeże Wyspiańskiego 27
tel.71-370-4617
marta.kopaczynska@pwr.edu.pl

Wrocław, 06.03.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej

Aktywność przeciwnowotworowa inhibitorów metylacji DNA w modelu raka jelita grubego

Autor rozprawy: mgr inż. Alicja Pawlak

Promotor: dr hab. Wojciech Kałas, Prof. nadzw.

**Zakład Onkologii Doświadczalnej, Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów,
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii
Nauk**

Recenzję rozprawy doktorskiej sporządzono na prośbę Dyrektora Instytutu dr hab. Jacka Rybki, Prof. nadzw., wyrażoną w piśmie RN/2/2019 z dnia 7 stycznia 2019 roku. Przewód doktorski jest prowadzony przez Radę Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Tematyka i charakter rozprawy doktorskiej

W Polsce odnotowano znaczną dynamikę liczby zachorowań na raka jelita grubego. Zapadalność na raka jelita grubego stanowi około 12 tysięcy zachorowań rocznie, a szacuje się, że do 2030 roku liczba zachorowań może wzrosnąć nawet dwukrotnie. Oznacza to, że skala zachorowalności i umieralności z powodu nowotworu jelita grubego nieustannie wykazuje tendencję wzrostową, a odsetek przeżyć pięcioletnich w Polsce dla raka okrężnicy i odbytnicy wynosi około 40% pomimo postępu we wczesnej diagnostyce i terapii.

Podstawową metodą terapeutyczną w nowotworach jelita grubego jest zabieg operacyjny. Drugimi metodami są radio- i chemioterapia. Z uwagi na dynamikę zachorowań oraz wysoką

toksyczność stosowanych terapii, konieczna jest dalsza wiedza w kierunku innowacyjnych metod leczenia.

W przedłożonej rozprawie podjęto próbę interpretacji mechanizmów modyfikacji epigenetycznych DNA w komórkach nowotworowych, co może przyczyniać się do zatrzymania ekspresji nowotworowych genów supresorowych. W praktyce klinicznej jest już grupa leków epigenetycznych wykorzystywana w terapii przeciwnowotworowej. Mechanizm ich działania zakłada, że lek naśladujący budowę cytozyny, wbudowywany podczas replikacji do DNA, wyłapuje i tym samym blokuje działanie enzymów metylotransferazy DNA. Zahamowanie metylacji może zatem stać się narzędziem terapeutycznym prowadzącym do uwrażliwienia komórek nowotworowych na inne chemioterapeutyki. Niestety mechanizm ich działania oraz schematy leczenia wciąż nie są dostatecznie poznane.

W pracy zaprezentowano krótko- oraz długoterminowy wpływ działania analogów cytydyny na komórki raka jelita grubego o różnej charakterystyce molekularnej. Zbadana została również kombinacja inhibitorów metylacji DNA (decytabiny oraz azacytydyny) z inhibitorami topoisomerazy I i II stosowanymi w chemioterapii w celu uwrażliwienia komórek raka jelita grubego.

Wykazano, że synergiczne zastosowanie inhibitorów metylacji DNA i inhibitorów topoisomerazy zwiększa toksyczność względem komórek raka jelita grubego. Ponadto zaobserwowano selektywne działanie inhibitorów metylacji DNA względem komórek prawidłowych.

W świetle tych badań przedstawiony efekt synergiczny może zostać wykorzystany w praktyce klinicznej w terapii raka jelita grubego oraz w leczeniu innych nowotworów złośliwych, a skuteczne zastosowanie kombinacji pozwala na zmniejszenie stężeń chemioterapeutyków przy zwiększeniu ich skuteczności z jednoczesnym zmniejszeniem skutków ubocznych po chemioterapii. Ponadto wiedza ta może być przydatna do oceny progresji nowotworów oraz skuteczności podjętego leczenia.

Struktura oraz zawartość rozprawy doktorskiej

Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Alicji Pawlak liczy wraz z bibliografią 75 stron. Rozprawa jest napisana w języku polskim, w postaci tradycyjnej monografii, obejmującej 7 rozdziałów, 21 rysunków, 8 tabel oraz 144 pozycje literaturowe. Rozprawa zawiera streszczenie w języku polskim oraz angielskim.

Rozdział 1 jest wprowadzeniem do zagadnień dotyczących mechanizmu działania inhibitorów metylacji DNA w komórkach prawidłowych oraz nowotworowych. Scharakteryzowano

zastosowane w pracy eksperymentalnej inhibitory metylacji oraz omówiono zagadnienia dotyczące raka jelita grubego.

W rozdziale 2 zaprezentowano cele badawcze rozprawy.

W rozdziale 3 przedstawiono materiał biologiczny zastosowany w pracy eksperymentalnej oraz szczegółowo opisano zastosowane metody badawcze, co podkreśla umiejętności Doktorantki w obsłudze wielu technik. W rozdziale omówiono również analizę statystyczną oraz bardzo szczegółowo przedstawiono schematy eksperymentów *in vitro* w postaci rycin.

Rozdział 4 jest bardzo rozbudowany. Zostały w nim zaprezentowane wyniki badawcze krótko- i długoterminowych efektów działania inhibitorów metylacji na linie komórkowe raka jelita grubego. Obserwowano jaki wpływ na żywotność komórek oraz stres retikulum endoplazmatycznego ma krótkoterminowy efekt przeciwnowotworowy decytabiny i azacytydyny. W przypadku długoterminowego efektu przeciwnowotworowego decytabiny i azacytydyny obserwowano wpływ na żywotność i morfologię komórek, cykl i proliferację komórek, ekspresję regulatorów cyklu i proliferacji komórek, ekspresję genów mitochondrialnych oraz na klonogenność komórek. Zaprezentowano również wyniki działania synergicznego inhibitorów metylacji DNA oraz inhibitorów topoisomerazy stosowanych aktualnie w chemioterapii nowotworów złośliwych. Zaprezentowano ich wpływ na żywotność i śmierć komórek, na ekspresję topoisomerazy II oraz na klonogenność komórek.

Rozdziale 5 zawiera bardzo obszerną dyskusję wyników. Natomiast w rozdział 6 umieszczono cenne i krótkie podsumowanie uzyskanych wyników.

Bibliografia przedstawiona w rozdziale 7 jest poprawnie dobrana i liczy 144 pozycje literaturowe.

Rozprawa jest bardzo starannie zredagowana, wyniki przedstawione w postaci wielu barwnych i bardzo czytelnych ilustracji, podział na rozdziały jest przemyślany i przejrzysty.

Ocena oryginalności rozprawy doktorskiej

W pracy przeprowadzono bardzo wiele eksperymentów badawczych, które zostały wyczerpująco omówione, a wiele uzyskanych wyników zasługuje na szczególne wyróżnienie.

Doktorantka wykazała, że decytabina i azacytydyna użyte w niskich stężeniach indukują szereg długoterminowych efektów na poziomie molekularnym w komórkach raka jelita grubego. Jednak tylko decytabina prowadzi do znacznego pogorszenia kondycji komórek, zahamowania ich proliferacji i upośledzenia klonogenności. Szczególnie ten ostatni wynik zasługuje na szczególne wyróżnienie, ponieważ zaburzenie klonogenności w kolejnych klonowaniach może mieć wpływ na

zmniejszenie chemooporności i stać się dodatkowym efektem terapeutycznym. Ponadto decytabina zwiększa ekspresję regulatorów cyklu komórkowego p21, p16 i cykliny D1 oraz zaburza aktywność szlaku sygnałowego PI3K/Akt, co może prowadzić do trwałego zatrzymania cyklu komórkowego.

Dowiodła, że kombinacje inhibitorów metylacji DNA i inhibitorów topoizomerazy obniżyły żywotność komórek. Zaobserwowała, że większy efekt cytotoksyczny na komórki został uzyskany w przypadku decytabiny z inhibitorem TOPO II, a w przypadku inhibitorów TOPO I zarówno decytabina jak i azacytydyna miały porównywalny efekt synergiczny.

Bardzo ciekawy jest fakt, że w badaniach długoterminowego działania inhibitorów metylacji DNA nie zaobserwowano zmian morfologicznych charakterystycznych dla apoptozy, a jedynie zahamowanie ich proliferacji oraz liczby komórek rakowych. Przy czym decytabina jest dużo silniejszym inhibitorem metylacji DNA niż azacytydyna. W związku z tym możliwe jest, że decytabina indukuje nieapoptotyczną śmierć komórkową, co wymaga dodatkowych badań w tej tematyce.

Szczegółowe uwagi merytoryczne i redakcyjne

Rozprawa została bardzo dobrze zredagowana, pojawiły się jednak pewne zagadnienia, które wymagają wyjaśnienia lub omówienia.

1. Dlaczego w schematach testów na żywotność komórek odstęp pomiędzy podaniem inhibitorów metylacji DNA a podaniem topoizomerazy wymagał 2 dni (rycina 18), a w testach na klonogenność 1 dzień (rycina 20A i B)? Czy sekwencyjne zastosowanie inhibitorów metylacji i topoizomerazy byłoby zasadne?
2. Doktorantka podkreśla, że azacytydyna i decytabina jako inhibitory metylacji DNA indukują w komórkach zmiany na poziomie molekularnym. Proszę o próbę odpowiedzi jakie zmiany strukturalne lub inne mogą się pojawić na poziomie kompleksu DNA-topoizomeraza? Czy obecność azacytydiny/decytabiny oraz inhibitorów TOPO I i II może zaburzać strukturę DNA?
3. Czy obserwowane przez Doktorantkę upośledzenie potencjału klonogennego komórek pod wpływem inhibitorów metylacji DNA może wpływać na chemowrażliwość komórek rakowych oraz ograniczenie opornych klonów?
4. Rozdział 2 (Cele pracy). W pracy zabrakło sprecyzowanych tez rozprawy doktorskiej.
5. W rozdziale 3.4 (Analiza mikroskopowa - barwienie komórek PureBlu Hoechst 33342) strona 22 „komórki przemywano buforem PBS (z Ca^{2+} i Mg^{2+})”. Jakie było stężenie jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} , czy miało ono wpływ na komórki oraz przebieg eksperymentu?

Praca została bardzo starannie napisana, chociaż Autorka nie ustrzegła się nielicznych błędów językowych, literówek i błędów interpunkcyjnych: na stronie 7 jest “signaling pathway” powinno

być “signalling pathway”; strona 11 zawiera kropki po tytułach, na stronie 12 „białko HP1, które, jak wcześniej wspomniano, prowadzi” powinno być „białko HP1, które jak wcześniej wspomniano prowadzi”; strona 22 „w 150 µl 4% paraformaldehydu” powinno być „w 150 µl 4% paraformaldehydzie”.

W Literaturze pojawiły się również nieprawidłowe cytowania: strona 69 **cytowanie 47** Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016;8. powinno być 2016;8(9); strona 71 **cytowanie 78** Fogh J, Trempe G. New Human Tumor Cell Lines. In: Fogh J, editor. Human Tumor Cells in Vitro. Springer US; 1975. p. 115–59. doi:10.1007/978-1-4757-1647-4_5 pojawił się numer doi.

Chciałabym podkreślić, że przedstawione przeze mnie pytania, zagadnienia do dyskusji oraz nieliczne błędy językowe i interpunkcyjne nie są uwagami krytycznymi i absolutnie nie wpływają na ogólną ocenę rozprawy.

Wnioski końcowe

Doktorantka zrealizowała założone cele badań, stosując przy tym bogaty warsztat badawczy i eksperymentalny, co świadczy o odpowiedniej wiedzy w zakresie nauk biologicznych w dziedzinie biologii nowotworów. Wyniki zostały przedstawione w trzech publikacjach z listy Filadelfijskiej, w tym BMC Cancer (IF 3.265), Steroids (IF 2.716) oraz Biochem. Biophys. Res. Commun. (IF 2.281).

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez *Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz.U. Nr 65 z dnia 16 kwietnia 2003 r., poz. 595 z późn. zm. oraz odpowiednie Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora*. Mając zatem na uwadze osiągnięte wyniki, dorobek naukowy Doktorantki oraz obowiązujące przepisy o stopniach i tytułach naukowych, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z uwagi na oryginalność otrzymanych wyników, ich wysoki potencjał badawczy oraz odpowiedni dorobek Doktorantki wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Alicji Pawlak.

Dr hab. Marta Kopaczyńska, Prof. ucz.