



## Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów

92-215 Łódź  
ul. Mazowiecka 6/8  
tel: 042 2725702  
fax: 042 2725694  
e-mail: malgorzata.czyz@umed.lodz.pl  
www/umed.lodz.pl/zbm

Ocena pracy doktorskiej

### pt. „ **Aktywność przeciwnowotworowa inhibitorów metylacji DNA w modelu raka jelita grubego**”

wykonanej przez p. mgr inż. Alicję Pawlak w Zakładzie Immunologii Doświadczalnej  
Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda  
Polskiej Akademii Nauk  
pod kierunkiem p. dr hab. Wojciecha Kałasy

Opcje terapeutyczne dla pacjentów z rakiem jelita grubego są różne, od klasycznej chemioterapii do terapii celowanej i immunoterapii, aczkolwiek żadna nie gwarantuje wyleczenia w zaawansowanym stadium rozwoju nowotworu. A zatem poszukiwania nowych terapii, szczególnie terapii skojarzonych, są jak najbardziej uzasadnione.

W swojej pracy doktorskiej p. mgr inż. Alicja Pawlak podjęła próbę zbadania efektów działania decytabiny i azacytydyny, inhibitorów metylacji DNA, w komórkach raka jelita grubego. Związki te były stosowane samodzielnie lub w skojarzeniu z innymi lekami przeciwnowotworowymi tj. irynotekanem, etopozydem, doksorubicyną i mitoksantronem. Badania przeprowadzono *in vitro*, a modelem badawczym były linie komórkowe raka jelita grubego o różnym profilu genetycznym.

## **1. Ocena części teoretycznej**

W części teoretycznej, Autorka przedstawia aktualny stan wiedzy na temat metylacji DNA w komórkach prawidłowych i nowotworowych, opisuje strukturę oraz kliniczne zastosowania decytabiny i azacytydyny. W tej części znajdujemy również krótki opis raka jelita grubego oraz zestawione w tabeli metody leczenia pacjentów z tym nowotworem. Część teoretyczna pracy nie jest obszernym opracowaniem, ale wskazuje na dobrą znajomość tematu. Bardzo istotny jest podrozdział omawiający znane efekty działania decytabiny i azacytydyny, związków, które były przedmiotem badań prezentowanych w rozprawie doktorskiej.

Podsumowując, część teoretyczna dysertacji opracowana jest w sposób, który stanowi dobre wprowadzenie do części doświadczalnej rozprawy. Z tej części pracy wynika, że wybór kierunku badań był uzasadniony.

## **2. Ocena metodyki badań oraz wartości merytorycznej pracy**

Praca doktorska jest bardzo rozbudowana od strony metodycznej. W badaniach Doktorantka zastosowała szereg metod biologii molekularnej i komórkowej, w tym analizę mikroskopową komórek, metodę kolorymetryczną do oceny zmian liczby żywych komórek, test klonogenności komórek, cytometrię przepływową do oceny proliferacji, śmierci komórkowej i dystrybucji komórek w cyklu komórkowym, qRT PCR w czasie rzeczywistym i Western-blotting do oceny wpływu leków na ekspresję wybranych genów oraz metodę Chou-Talalaya do oceny współdziałania leków. Opisy metod są wystarczająco szczegółowe. Jedynym zastrzeżeniem jest brak informacji o ilości białka nakładanego na żel w metodzie SDS-PAGE.

W pracy przedstawiono molekularną charakterystykę linii komórkowych raka jelita grubego, które zastosowano w badaniach. Została ona przedstawiona w tabeli, aczkolwiek w całej pracy brak jest odniesień do tych informacji, a w szczególności czy profil genetyczny obejmujący mutacje w podstawowych onkogenach i genach supresorowych, rodzaj niestabilności genetycznej oraz fenotyp metylatorowy wysp CpG (CIMP) mógłby mieć znaczenie dla mechanizmu działania badanych związków. Koncepcja pracy nie budzi zastrzeżeń. W dysertacji przedstawiono schematy poszczególnych doświadczeń, których głównym celem było określenie długoterminowych efektów działania decytabiny i azacytydyny, zastosowanych w niskich stężeniach.

W dysertacji p. mgr inż. Alicja Pawlak wykazała, że decytabina użyta w niskim stężeniu (1  $\mu\text{M}$ ) prowadzi do zahamowania proliferacji komórek raka jelita grubego i zmniejszenia odsetka komórek o potencjale klonogennym. Decytabina indukuje zmiany na poziomie molekularnym, które utrzymują się przez wiele dni po usunięciu leku z podłoża hodowlanego. Wśród tych efektów należy wyróżnić: zwiększoną ekspresję inhibitorów cyklu komórkowego p21 i p16, zwiększoną ekspresję cykliny D1 oraz zmiany aktywności szlaku sygnałowego PI3K/AKT. W dyskusji tych wyników zabrakło odniesienia do podwyższonej ekspresji cykliny D1 przy jednoczesnym hamowaniu proliferacji po zastosowaniu inhibitorów metylacji DNA. Azacytydyna wykazuje silniejsze działanie w trakcie jej stosowania, natomiast efekty odległe w czasie są dużo słabsze niż w przypadku efektów indukowanych przez decytabinę. Zastosowanie decytabiny w skojarzeniu z lekami przeciwnowotworowymi zwiększa ich cytotoksyczność. Ważne jest, że w pracy zbadano również wpływ obu związków na komórki prawidłowe nabłonka jelita cienkiego linii FHs i nie stwierdzono efektu cytotoksycznego, zarówno po krótkiej trzydniowej inkubacji z lekami jak i 10 dni po usunięciu leków z podłoża hodowlanego. Jakość poszczególnych wyników i ich analiza statystyczna nie budzą zastrzeżeń. Nie jest natomiast jasne w jaki sposób

dokonywano wyboru linii komórkowych do badań przeprowadzonych różnymi metodami. W wyjściowych badaniach, do oceny zmian liczby żywych komórek pod wpływem leków po krótkiej inkubacji, zastosowano sześć linii komórkowych. Decytabina nie miała wpływu na liczebność populacji w szerokim zakresie stężeń, natomiast wartości  $IC_{50}$  dla azacytydyny były różne dla różnych linii komórkowych. Te same linie komórkowe wykorzystano do oceny rodzaju współdziałania (synergizm, efekt addytywny lub antagonistyczny) decytabiny i azacytydyny z irynotekaniem, etopozydem, doksorubicyną i mitoksantronem w zakresie zmiany liczby żywych komórek. Natomiast w każdym innym doświadczeniu wybór linii komórkowych jest dość przypadkowy. Dlaczego do oceny wpływu leków na indukcję stresu retikulum endoplazmatycznego mierzoną ekspresją CHOP wybrano linie DLD-1 i HT-29, do oceny zmian w morfologii komórek pod wpływem leków linię DLD-1, do oceny zmian w proliferacji linie DLD-1, HT-29 i RKO, do oceny wpływu na ekspresję większości genów linie DLD-1 i HT-29, natomiast na poziom transkryptu p16 i białka p21 już tylko linię DLD-1, a na poziom ekspresji genów mitochondrialnych tylko linię HT-29? Tym bardziej zaskakujące jest użycie linii HCT116 i SW948 do oceny poziomu śmierci komórkowej indukowanej inhibitorami metylacji DNA zastosowanymi w skojarzeniu z innymi w/w związkami o aktywności przeciwnowotworowej. Jaki był klucz wyboru linii komórkowych na poszczególnych etapach badań? Dlaczego nie zastosowano w większości badań linii RKO, w której decytabina zastosowana w niskim stężeniu indukowała największe zmiany odległe mierzone spadkiem liczby żywych komórek po 10 dniach od usunięcia leku? Jest to szczególnie zastanawiające, gdyż komórki RKO jako jedyne spośród badanych przez Doktorantkę mają mutację w *BRAF*, wykazują niestabilność mikrosatelitarną (MSI<sup>+</sup>) i fenotyp metylatorowy wybranych wysp CpG (CIMP<sup>+</sup>). W świetle ostatnio opublikowanych wyników mutacja w *BRAF* indukuje swoistą dla określonych genów hipermetylację DNA (Bond i wsp. 2018 Epigenetics). Byłoby zatem interesującym

sprawdzenie czy pod wpływem decydabiny i/lub azacytydyny następuje zmiana ekspresji genów. W dyskusji pojawia się informacja, że badano wpływ inhibitorów metylacji DNA na szlak RAS/RAF/MEK/ERK w 3 liniach i wyniki były 'niekonkluzywne', ale nie badano tego efektu w linii komórkowej RKO. Dlaczego?

Próba interpretacji uzyskanych wyników świadczy o dobrej znajomości tematu. Interesujące są wyniki przedstawiające współdziałanie inhibitorów metylacji DNA i inhibitorów topoisomerazy, które to wyniki Doktorantka konfrontuje z wynikami uzyskanymi w innych laboratoriach. Niewątpliwie ważnym wynikiem jest wpływ inhibitorów metylacji DNA na potencjał klonogeny badanych komórek. Doktorantka zastanawia się w Dyskusji nad mechanizmem tego zjawiska. Komórki o dużym potencjale klonogenym w wielu nowotworach traktowane są jako komórki bardziej prymitywne (tzw. *cancer stem cells*). Mogłoby to oznaczać, że decytabina bardziej wydajnie eliminuje komórki prymitywne niż zróżnicowane. Czy mogłoby to mieć związek z różnym wzorem metylacji w komórkach prymitywnych i bardziej zróżnicowanych?

Autorka cytuje najważniejsze pozycje piśmiennictwa światowego, ale odnosi się wrażenie, że praca nie wpisuje się w główny nurt badań mających na celu znalezienie skutecznych leków o aktywności przeciwnowotworowej. Artykuły opublikowane w ciągu ostatnich pięciu lat stanowią mniej niż 20% artykułów zacytowanych w dysertacji.

Dyskusję kończy lista pytań, które powstały w oparciu o uzyskane wyniki i mogą być podstawą postawienia kolejnych hipotez badawczych.

Podsumowując, uzyskane wyniki są wartościowe i mogą stanowić podstawę do ubiegania się o stopień doktora nauk biologicznych. Obowiązkiem recenzenta jest przedstawić uwagi krytyczne, na które Doktorantka powinna odpowiedzieć w trakcie obrony pracy doktorskiej.

### 3. Ocena strony redakcyjnej pracy doktorskiej

Recenzowana praca doktorska ma typowy układ dysertacji w zakresie nauk przyrodniczych. Układ rozprawy pozwala czytelnikowi na sprawne poruszanie się w całości pracy. Ryciny w pracy wykonano bardzo starannie, a ich dokładne opisy ułatwiają czytelnikowi zapoznanie się z wynikami badań. Dodatkowo praca zawiera bardzo pomocne schematy doświadczeń. Przedstawione opracowanie liczy 75 ponumerowanych stron i zawiera ryciny (21), tabele (8) oraz schematy doświadczeń. W przygotowaniu pracy wykorzystano 144 pozycje literaturowe.

Dysertacja napisana jest starannie, komunikatywnym językiem. W pracy znaleziono niewielką liczbę błędów oraz kilka nieprawidłowo użytych lub niezręcznych określeń. Są to m.in.:

- 'medium' powinno być 'podłoże';
- 'podwirowywano';
- 'wyindukowała ekspresję';
- 'kombinacje inhibitorów', powinno być 'inhibitory stosowane w skojarzeniu';
- 'trwałość uszkodzenia klonogenności';
- 'toksyczność' powinno być 'cytotoksyczność'.

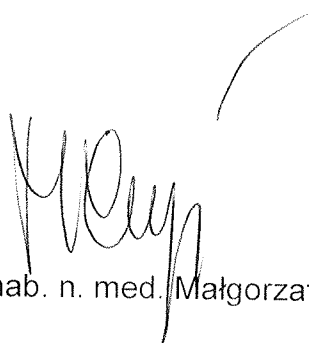
Ponadto, w skrótach nazw białek wszystkie litery powinny wielkie, np. RAS/RAF/MEK/ERK zamiast Ras/Raf/MEK/ERK, tym bardziej, że wszystkie wykorzystane w badaniach linie komórkowe pochodzą z guzów pobranych od pacjentów. Nie wszystkie skróty są w Spisie Skrótów. Ich rozwinięcia brakuje również w miejscach, w którym pojawiają się w tekście po raz pierwszy. Poza tymi drobnymi niedociągnięciami stwierdzam, że praca w warstwie edytorskiej została przygotowana poprawnie, zgodnie z normami przyjętymi dla prac doświadczalnych.

Autorka nie podaje, czy wyniki przedstawione w pracy doktorskiej zostały opublikowane.

### 3. Wnioski końcowe recenzji

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska p. mgr inż. Alicji Pawlak, przygotowana pod kierunkiem p. dr hab. Wojciecha Kałasa, dotyczy interesującego zagadnienia naukowego o potencjalnym znaczeniu i praktycznym. Część doświadczalna pracy została zrealizowana z wykorzystaniem odpowiednich metod badawczych. Uzyskane wyniki zostały zinterpretowane w sposób interesujący w oparciu o obserwacje własne i doniesienia literaturowe. Uwagi krytyczne, które powstały podczas czytania pracy nie wpływają na pozytywną ocenę pracy. Wątpliwości, które powstały w trakcie czytania rozprawy, np. dotyczące wyboru linii komórkowych, powinny zostać rozstrzygnięte w czasie obrony.

Uważam, że rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z Art. 13 Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.; D.U. z dnia 22 grudnia 2014 roku, poz. 1852, tekst jednolity). Mam zatem zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej p. mgr inż. Alicji Pawlak i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na walory naukowe pracy, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.



/Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Czyż/

Łódź, 4 marca 2019 r