



Warszawa, 23.07.2021 r.

Dr hab. Elżbieta Speina
Pracownia Biologii RNA

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Beaty Mossakowskiej

**pt. Mechanizmy molekularne przyczyniające się do
powstawania oporności na terapię fotodynamiczną z użyciem
kwasu 5-aminolewulinowego w nowotworach sromu.
Możliwe cele terapeutyczne**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Zakładzie Onkologii Molekularnej i Translacyjnej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Janusz Siedlecki, a promotorem pomocniczym dr Anna Fabisiwicz.

Tematyka przedłożonej do zaopiniowania pracy wpisuje się w zagadnienia realizowane w zespole Promotora, dotyczące szeroko rozumianych mechanizmów kancerogenezy oraz poszukiwania metod ulepszenia terapii nowotworów. Według Światowej Organizacji Zdrowia nowotwory złośliwe są dużą grupą chorób, które mogą się rozwijać w prawie każdym narządzie lub tkance organizmu, a odpowiedzialne za nie są komórki rosnące nieprawidłowo w sposób niekontrolowany. Choroby nowotworowe są drugą najczęstszą przyczyną zgonów na świecie, dlatego obserwuje się ciągły rozwój terapii, które pozwalają na ich leczenie. Postęp, jaki się dokonał w tej dziedzinie w ostatnich dwudziestu latach, pozwala na skuteczne leczenie niektórych typów nowotworów złośliwych. Niestety, pomimo intensywnych badań, jest jeszcze wiele ich odmian, wobec których opracowane terapie nie są efektywne. Stosowane obecnie metody leczenia nowotworów sromu opierają się na połączeniu zabiegów chirurgicznych i radioterapii z traktowaniem farmakologicznym. Jedną z nowatorskich, choć wciąż marginalnych metod

proponowanych do leczenia jest terapia fotodynamiczna (PDT), która stosowana jest do mało-inwazyjnego traktowania licznych zmian neoplastycznych, zarówno łagodnych, jak i złośliwych. PDT polega na podaniu leku fotouczulającego, który aktywowany światłem o odpowiedniej długości fali powoduje powstanie cytotoksycznych i genotoksycznych reaktywnych form tlenu. Niestety, obserwuje się rozwój oporności na PDT w komórkach neoplastycznych. Oceniana tu rozprawa stanowi próbę przybliżenia do wyjaśnienia mechanizmów molekularnych leżących u podłoża rozwoju oporności na terapię fotodynamiczną. Dogłębne poznanie tych procesów ma znaczenie nie tylko poznawcze, ale również ogromny potencjał praktyczny, gdyż zwiększenie efektywności PDT przez pokonanie oporności komórek neoplastycznych może być kluczowe dla powodzenia tej terapii. Doktorantka do swoich badań wybrała modele komórkowe. Ustalone linie wyprowadzone z komórek nowotworowych są dobrze scharakteryzowanym i uznanym, choć uproszczonym modelem badań nad procesami zachodzącymi w guzach nowotworowych

Cele pracy zostały przedstawione w trzech podpunktach. Po pierwsze, Autorka podjęła udaną próbę wyprowadzenia dwóch linii komórkowych, płaskonabłonkowego raka sromu, opornych na PDT z linii macierzystych. Drugim celem była wielkoskalowa analiza proteomiczna i porównanie profili komórek opornych i wrażliwych. Wyniki tych analiz pozwoliły na wytypowanie celów molekularnych do dalszych szczegółowych analiz porównawczych. Trzecim, ambitnym wyzwaniem badawczym okazało się podjęcie próby uwrażliwienia komórek opornych poprzez zastosowanie inhibitora jednego ze szlaków naprawy DNA.

Rozprawa doktorska pod względem edytorskim przygotowana jest bardzo starannie. Doktorantka posługuje się jasnym, poprawnym językiem naukowym. Układ rozprawy jest typowy dla prac promocyjnych. Jest to obszerny klasyczny manuskrypt składający się ze 160 stron. Rozprawa podzielona została na pięć rozdziałów, z których każdy stanowi mniejszą całość. Tekst opatrzone jest gruntownie dopracowanym, autorskim materiałem ilustracyjnym. Ryciny przygotowane są również bardzo starannie, z dużą dozą estetyki i wszystkie są zrobione w podobnej konwencji, co umożliwia łatwe zorientowanie się w wynikach i zwiększa ich czytelność. Wyniki zostały poprawnie opracowane od strony statystycznej. Wstęp poprzedzony jest bardzo drobiazgowym, starannie przygotowanym i konsekwentnym wykazem stosowanych skrótów. Następnie, Autorka w dość zwięzły sposób informuje o aktualnym stanie wiedzy w omawianej dziedzinie. Na osiemnastu stronach Wstępu opisany jest mechanizm działania terapii

fotodynamicznej, ze szczególnym uwzględnieniem udziału kwasu 5-aminolewulinowego jako fotouczulacza. W dalszej kolejności omówione zostały typy śmierci komórkowej indukowane PDT oraz destrukcyjny wpływ PDT na DNA i guzy nowotworowe. Wstęp kończy przedstawienie zmian towarzyszących nabyciu oporności na PDT. Wydaje mi się, że opisy wymienionych procesów są zbyt lakonicznie i budzą pewien niedosyt. Rozprawa zyskałaby na bardziej szczegółowych opisach. Brakuje mi też omówienia zastosowań PDT w aktualnej terapii przeciwnowotworowej. Czy terapia fotodynamiczna jest obecnie stosowana w Polsce, np. w Centrum Onkologii w Warszawie? Część doświadczalna jest przygotowana rzetelnie i w uporządkowany sposób. Opisy warunków eksperymentalnych są dokładne i wystarczająco szczegółowe, by móc zostać powtórzone w niezależnych eksperymentach przez innych badaczy. Wartość zaprezentowanych nowych metod w pracy jest duża i oceniam ją bardzo wysoko. Wyniki zostały przedstawione na 41 stronach i prezentują cykl bardzo starannie zaplanowanych doświadczeń. Najpierw Pani Beata Mossakowska przedstawiła dokumentację wyprowadzenia linii opornych na PDT z komórek macierzystych. Następnie zaprezentowała wyniki analiz proteomicznych różnicujących komórki odporne i wrażliwe. Wykazała liczne zmiany w profilach białkowych towarzyszące pojawianiu się oporności w liniach komórkowych A-431 i CAL-39. Zmiany te obejmowały, w zależności od linii, białka cytoszkieletu, szlaków sygnałowych, naprawy DNA, ochrony przed stresem oksydacyjnym, proteasomu, homeostazy wapnia i transportu komórkowego oraz metabolizmu oddechowego. Kolejnym etapem były szczegółowe analizy komórkowe i molekularne. Opracowanie wyników nie budzi zastrzeżeń, są one przekonujące i prawidłowo zinterpretowane. Wszystkie opisy pod rycinami w pełni pozwalają zorientować się, co dany wykres/zdjęcie zawiera. Przeprowadzona w rozprawie obszerna dyskusja wyników, mieszcząca się na 20 stronach, dokonana na podstawie licznych danych literatury przedmiotu (203 pozycje), pozwoliła Doktorantce na rzeczową konfrontację własnych wyników z zastanym stanem wiedzy. Wykazała się ona dużą wiedzą i skrupulatnością, oraz konsekwencją w odnoszeniu się do danych obecnych w literaturze. Podsumowanie kończące pracę zawiera najważniejsze refleksje płynące z ocenianej tu rozprawy doktorskiej, a Wnioski zebrane są w zwięzłe punkty, co pozwala czytelnikowi w jasny sposób ocenić zawartość całości. Rozprawę uzupełnia materiał dodatkowy w formie załącznika zawierającego tabele prezentujące wyniki analiz proteomicznych. Należy podkreślić, że Doktorantka bardzo dobrze porusza się w badanym temacie i niewątpliwie posiada dużą wiedzę w tym zakresie, jak i operuje nią w sposób swobodny. Zaplanowane doświadczenia były pracochłonne, ale ich analiza wymagała równie

dużego wysiłku. Mimo że nie wszystkie wyniki pokazują spektakularne różnice, to przedstawiona praca jest przykładem solidnego i rzetelnego podejścia do zagadnienia. Podczas czytania rozprawy nasunęło mi się parę pytań, które, mam nadzieję, przyczynią się do ciekawej dyskusji podczas obrony.

1. Nie podano informacji na temat źródła/źródeł pochodzenia linii komórkowych płaskonabłonkowego raka sromu (A-431 i CAL-39), nowotworu piersi (MCF10A), embrionalnej nerki (HEK293T) oraz fibroblastów (K21). Jest tylko informacja, że linie te uzyskano z Zakładu Biologii Molekularnej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN oraz ze zbiorów Zakładu Onkologii Molekularnej i Translacyjnej Narodowego Instytutu Onkologii. Brak jest też informacji, czy linie te były testowane w celu wykluczenia zakażenia mykoplazmą.
2. Str. 41: Nie bardzo rozumiem, co oznacza sformułowanie: „Komórki, które przeżyły, hodowano w pożywce hodowlanej, aż wyzdrowiały...”?
3. Nie wykonano weryfikacji danych uzyskanych z analiz proteomicznych metodą ilościowego PCR i/lub Western blot. Wyniki potwierdzono tylko metodą immunocytochemiczną, która jest jednak mniej dokładna. Wydaje mi się, że takie analizy dla wybranych danych należałoby przeprowadzić przed próbą publikacji wyników opisanych w rozprawie.
4. Str. 73-74, rozdział 4.8: Autorka donosi tu o sprawdzaniu zdolności antyoksydacyjnej komórek opornych i wrażliwych przed i po PDT, jednak prezentuje doświadczenia oceniające wyłącznie poziom stresu oksydacyjnego, Co nie jest tożsame ze zdolnościami antyoksydacyjnymi. Wyższy poziom stresu w komórce może oczywiście wskazywać na obniżenie aktywności (pojemności) antyoksydacyjnej komórek, ale tego nie dowodzi. Inną przyczyną może być zwiększony poziom wytwarzania reaktywnych form tlenu. Oba te czynniki przyczyniają się do zwiększonego poziomu stresu oksydacyjnego. Dobrze byłoby zatem przedstawić również wyniki doświadczeń oceniających aktywność głównych enzymów antyoksydacyjnych, takich jak np. dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej i S-transferazy glutationowej. Chciałabym się dowiedzieć czy były mierzone poziomy tych enzymów, czy też był wykonany jakiś inny test oceniający bezpośrednio pojemność antyoksydacyjną komórek?
5. Str. 86, rys. 1: powinien być oznaczony jako rys. 36.

6. Str. 89, rys. 39: Dlaczego w przypadku komórek K21, HEK293T i MCF10A nie zastosowano wyższych stężeń inhibitora endonukleazy APE1, AR03, tak jak w przypadku komórek A-431 (rys. 38)?
7. Czy przeprowadzono doświadczenia sprawdzające, czy naprawa DNA jest hamowana w komórkach traktowanych inhibitorem AR03?

Wymienione powyżej uwagi krytyczne nie mają wpływu na ocenę wartości merytorycznej pracy; oceniam bardzo wysoko. Biorąc pod uwagę zainteresowanie PDT w leczeniu nowotworów oraz potrzebę podejść terapeutycznych, które mogą doprowadzić do przezwyciężenia oporności, uważam wybór problemu badawczego za w pełni uzasadniony, a wyniki uzyskane przez Doktorantkę za oryginalne i przynoszące znaczące ustalenia w zakresie opisu mechanizmów komórkowych pośredniczących w oporności na PDT. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do wyznaczenia nowych, potencjalnych celów terapeutycznych. Należy podkreślić, że interpretacja wyników jest rzeczowa, pozbawiona nadinterpretacji, co wskazuje na krytyczne podejście do otrzymanych danych oraz dojrzałość naukową Doktorantki. Biorąc to pod uwagę, stwierdzam, iż **przedstawiona do oceny rozprawa w pełni spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789)**. Zwracam się zatem do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o jej przyjęcie i dopuszczenie pani mgr Beaty Mossakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Guilieta Speha