

Bydgoszcz, 15.07.2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr Karoliny Gajdy** pt.

„Reaktywne formy tlenu w przebiegu cyklu komórkowego i odpowiedzi komórek prawidłowych i nowotworowych na promieniowanie jonizujące.”

wykonanej w Państwowym Instytucie Badawczym, Oddział w Gliwicach Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej –Curie
pod kierunkiem prof. dr. hab. Joanny Rzeszowskiej
oraz dr hab. inż. Sebastiana Studenta w roli promotora pomocniczego.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi spójną tematycznie monografię dotyczącą wpływu procesów regulujących potencjał oksydoredukcyjny komórki na jej cykl komórkowy/proliferaację, jak i na zmiany prowadzące do śmierci apoptotycznej czy też nekrotycznej. Temat reaktywnych form tlenu (RFT), pomimo lekkiego spowolnienia w ostatniej dekadzie, nadal jest bardzo aktualny ze względu na niepodważalny udział RFT w patomechanizmie takich procesów jak; kancerogeneza, zmiany miażdżycowe, neurodegeneracyjne czy stany zapalne w szerokim tego słowa znaczeniu. Coraz więcej informacji pojawia się na temat znaczenia RFT jako czynnika regulacyjnego, uczestniczącego w transdukcji sygnałów komórkowych czy też zaangażowanego bezpośrednio w przebieg wielu procesów metabolicznych. Oksydacyjne uszkodzenia DNA są niewątpliwą przyczyną mutagenyzy a w konsekwencji, niezbędnym czynnikiem prowadzącym do powstawania i rozwoju nowotworów. Zmiany w komórkach nowotworowych dotyczą zarówno zaburzeń związanych z proliferacją i różnicowaniem się komórek ale i ze zmianami metabolicznymi i strukturalnymi prowadzącymi do różnorodności fenotypowej. To z kolei powoduje szereg trudności związanych zarówno z diagnostyką jak i leczeniem pacjentów z chorobą nowotworową. Jedną z trzech podstawowych strategii terapeutycznych nowotworów, obok chirurgii i chemioterapii, jest radioterapia. Mechanizm działania niektórych leków stosowanych w chemioterapii jak i promieniowania jonizującego sprowadza się do bezpośrednich interakcji z biomolekułami lub/i pośrednio, poprzez generowanie reaktywnych form tlenu, wywołując w komórkach „stres oksydacyjny”. Wobec powyższego, temat pracy doktorskiej jest bardzo aktualny, a zastosowane modele badawcze wskazują na dużą nowatorskość przeprowadzonych badań.

Praca doktorska przygotowana bardzo starannie i poza standardowymi elementami, typu: spis treści, skróty, streszczenie, literatura, zawiera informacje o stypendiach związanych z prowadzonymi badaniami oraz wykaz publikacji, rozdziałów w książce i doniesień konferencyjnych zawierających część wyników badań zawartych w recenzowanej pracy doktorskiej. We wstępie teoretycznym sporo miejsca poświęcono szczegółom dotyczącym przebiegu i regulacji cyklu komórkowego z uwzględnieniem punktów kontrolnych i

powiązania ich z uszkodzeniami DNA. Kolejnym dużym tematem poruszonym we wstępie były wolne rodniki tlenowe, ich powstawanie, metabolizm, źródła oraz możliwości obronne organizmu przed ich działaniem w postaci systemów antyoksydacyjnych. Następnie Doktorantka dokonała przeglądu literaturowego dotyczącego udziału RFT w regulacji cyklu komórkowego, wpływu promieniowania jonizującego na procesy komórkowe przez pryzmat uszkodzeń i efektów biologicznych. Wprowadzenie do tematyki badawczej zakończono danymi dotyczącymi ograniczeń związanych z radioterapią, szczególnie wskazując na różnice w promieniowrażliwości komórek. Zawarte we wstępie teoretycznym treści, czasem może zbyt szczegółowe, w innych miejscach może zbyt zdawkowe, w moim przekonaniu dobrano poprawnie, pozwalając czytelnikowi lepiej zrozumieć problemy stawiane do rozwiązania w Celach Pracy.

Sprecyzowano cele, w których główne miejsce zajmuje zbadanie powiązań między produkcją i neutralizacją RFT przez komórki a przebiegiem cyklu komórkowego. Sprawdzenie odmienności tych procesów w różnych liniach komórkowych wyprowadzonych z komórek prawidłowych oraz z komórek nowotworowych. Powiązanie poziomu RFT z fazami cyklu komórkowego w warunkach standardowych oraz w stresie wywołanym promieniowaniem jonizującym. Autorka doprecyzowała etapy badań poprzez ustalenie pośrednich celów badawczych, co w znaczący sposób porządkuje procedury eksperymentalne, nie rzadko kolejne, zależne od wyników poprzednich zadań.

Doktorantka w rozdziale Materiały i Metody opisała wybrane linie komórkowe, warunki napromieniania hodowli komórkowych i traktowania komórek inhibitorami cyklu komórkowego oraz bardzo szczegółowo opisała metody analityczne. Pozytywnie oceniam dobór metod, począwszy od standardowych, typu: spektrometrycznych, mikroskopii optycznej, PCR, poprzez mikroskopie fluorescencyjną, mikromacierze do cytometrii przepływowej w różnych wariantach. Na uwagę zasługują badania przyżyciowe cyklu komórkowego za pomocą systemu reporterowego FUCCI oraz oznaczanie długości cyklu komórkowego w systemie mikroprzepływowym, które są dość unikatowe.

Część eksperymentalną przeprowadzono w bardzo logicznej kolejności. W pierwszym etapie scharakteryzowano cykl komórkowy, czas podwojenia populacji, przeżywalność komórek, zmiany poziomu RFT w czasie hodowli oraz testowano różne metody blokowania komórek w różnych fazach cyklu. Nie powiodła się próba blokowania cyklu komórkowego linii HCT116 tymidyną, natomiast skutecznie blokowano cykl w fazie G1 poprzez głodzenie oraz w fazie G2 traktując komórki nokodazolem. Udało się zsynchronizować w fazie G2 linie HCT116, K562, HL60 oraz Ca46. Oceniono poziom apoptozy w blokowanych komórkach w celu sprawdzenia toksyczności. W drugim etapie przeprowadzono badania na zsynchronizowanych komórkach. Oceniono zmiany poziomu RFT i anionorodnika ponadtlenkowego oraz masę mitochondrialną i potencjał błonowy mitochondriów w fazie G2 w stosunku do komórek kontrolnych. Dla linii HCT116 porównano poziom ekspresji genów w fazie G1 i G2 korzystając z mikromacierzy. Wytypowano geny związane z produkcją RFT oraz z działaniem antyoksydacyjnym, których ekspresja różniła się względem komórek kontrolnych. Wykazano, że w fazie G2 nadekspresję wykazują geny kodujące białka związane z produkcją anionorodnika ponadtlenkowego a obniżoną ekspresję geny kodujące enzymy antyoksydacyjne. W fazie G0/G1 obserwowano przeciwne zależności.

Badania cykli pojedynczych komórek wykonano przy użyciu systemu reporterowego FUCCI oraz w komorach mikroprzepływowych. Transfekcja do komórek HCT116 systemu reporterowego FUCCI nie powiodła się natomiast skutecznie udało się transfekować komórki HEPA 1-6. Długość cyklu komórkowego w pojedynczych komórkach w komorach mikroprzepływowych wykonano z użyciem linii HeLa. W tym eksperymencie sprawdzano także czy komórki mają zdolności do dziedziczenia długości cyklu komórkowego. Wykazano mniejsze różnice w długości cyklu komórkowego komórek siostrzanych niż w przypadku cykli matek i córek.

Ostatnim etapem badań były eksperymenty na populacjach różnych typów komórek poddanych działaniu promieniowania jonizującego. Komórki napromieniano dawką 4 lub 12Gy. Badania tempa proliferacji po ekspozycji wykazały obniżenie tego parametru przy 4Gy i wzmocnienie efektu przy 12Gy dla komórek szybko dzielących się. Komórki wolno dzielące się NHDF i Me45 zachowywały się odmiennie. Fibroblasty były wrażliwe na dawkę 12Gy a komórki czerniaka dawką 4Gy po 36 h stymulowane były do podziałów. Porównanie odsetka komórek apoptotycznych i nekrotycznych wykazuje bardzo duże zróżnicowanie zarówno w odniesieniu do badanej linii jak i co do czasu po ekspozycji. To bardzo wyraźnie wskazuje na różnice w promieniowrażliwości zależnej od typu komórki. Oceniono również proporcje komórek w fazie G1 i w fazie G2 oraz zmiany poziomu RFT i anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach, w różnym czasie po napromienianiu dawką 4Gy. Promieniowanie jonizujące zmniejsza proliferację komórek co potwierdzono badaniem ekspresji antygenu jądrowego Ki67 dla linii HCT116 i Me45.

Uzyskane z przeprowadzonych eksperymentów wyniki Doktorantka przedyskutowała z dość obszerną literaturą z ostatnich lat dotyczącą tematyki stresu oksydacyjnego, regulacji cyklu komórkowego oraz działania promieniowania jonizującego na komórki nowotworowe. Podobnie jak w dobrze zaplanowanej części eksperymentalnej, w dyskusji Autorka wykazała się dużą systematycznością i kolejno każdą z obserwacji porównywała z danymi uzyskanymi przez inne zespoły badawcze oraz szukała danych pozwalających na wyjaśnienie rozbieżności, ewentualnie tłumaczących potencjalny mechanizm zmian obserwowanych w eksperymencie.

Do najciekawszych efektów przeprowadzonych badań niewątpliwie należą obserwacje dotyczące różnic w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące lub blokadę cyklu komórkowego różnych typów komórek nowotworowych i prawidłowych. Różne typy komórek wykorzystują różne szlaki oksydoredukcyjne przystosowując się do warunków stresowych i zwiększając swoją żywotność. To niewątpliwie ma bardzo istotne znaczenie poznawcze z punktu widzenia nauk podstawowych ale i pod kątem klinicznym, przez pryzmat skuteczności radioterapii.

Dysertacja kończy się Podsumowaniem, w którym Doktorantka wskazała na kilka ważnych aspektów: różnice w populacjach komórek w zależności od typu nowotworu oraz brak inhibicji kontaktowej proliferacji, wzrost poziomu RFT w fazie G2 cyklu komórkowego niezależnie od typu komórek i wskazanie roli RFT jako czynnika regulacyjnego. W niektórych liniach komórkowych wykazano spadek stężenia anionorodnika ponadtlenkowego w fazie G2 (pomimo wzrostu RFT) tłumacząc to zmianami ekspresji/aktywności syntazy tlenu azotu. Ponadto wykazano, że dla większości badanych komórek, ekspozycja na promieniowanie jonizujące (4Gy) prowadzi do zmniejszenia proliferacji, zatrzymania cyklu w fazie G2, zwiększenia apoptozy i produkcji RFT. Odmiennie na promieniowanie jonizujące reagowały

komórki czerniaka, blokowane początkowo w fazie G0/G1 po kilku godzinach od napromieniania zwiększały proliferację.

Puentując ten etap recenzji, stwierdzam, że postawione cele pracy zostały w pełni osiągnięte, a wyniki przeprowadzonych badań mają bardzo duże znaczenie poznawcze a dodatkowo mogą być wykorzystane w rozważaniach strategii leczenia różnych typów nowotworów, szczególnie opornych na standardowe procedury terapeutyczne.

Co do drobnych niedociągnięć to muszę przyznać, że nie ma ich dużo. Rozprawa napisana poprawnym językiem z zachowaniem dobrego stylu, czyta się z przyjemnością.

Niemniej jednak, na str. 26 informacje o ozonie są mało precyzyjne. Nie zgadzę się z informacją o powstawaniu ani o czasie półtrwania. Rozumiem, że informacje te pochodzą z zacytowanej pracy, ale może dobrze by było skorzystać z innych źródeł. Pozwolę sobie, sprowokowany tą nieścisłością, dopytać Doktorantkę, czy zna zastosowanie ozonu, w tym również terapeutyczne? W jaki sposób otrzymywany jest ozon i w jaki sposób używany w medycynie?

Na str. 33 w podrozdziale „Reaktywne formy tlenu i cykl komórkowy” opisywane są różne zależności poziomu RFT i ekspresji różnych genów. Czy Doktorantka spotkała się z informacjami na temat białka LSD1 odpowiedzialnego za generowanie H_2O_2 w kontakcie z chromatyną i hipotezie związanej z powstawaniem w tych miejscach 8-oksyG, a poprzez rekrutację białek naprawy, pośredni udział w procesie transkrypcji?

Z innych nieścisłości chciałbym wskazać na str. 98 - *Ocena markiera proliferacji komórkowej* - ostatnie zdanie jest mało poprawne stylistycznie, ale bardziej wyniki zawarte w tym podrozdziale nie pasują mi do zdania z Dyskusji (str. 121 ... *Wyjątek stanowiły komórki Me45, a brak zahamowania proliferacji w tej linii potwierdzony został przez oznaczenie poziomu markera Ki67....*). Dopytałbym jeszcze o znaczenie Ki67 w diagnostyce i monitorowaniu leczenia nowotworów.

Z drobnych błędów edytorskich, z powinności, zwracam uwagę na przykładowe:

- na str. 25 wiersz 14 – „Czas półtrwania nadtlenoazotynu wynosi 10^3 sekund w jakim się znajduje rodnik”- coś uciekło ze zdania.
- na str. 109 i 110- ryciny 59 i 60, górne wykresy zaopatrzone są w błędny opis osi X
- w innych miejscach to albo literówki, albo pewne uproszczenia, których pozwolę sobie nie wymieniać.

Analizując przedstawione opracowanie stanowiące podstawę do ubiegania się o stopień doktora, należy stwierdzić, że mgr. Karolina Gajda opanowała bardzo dobrze warsztat metodyczny, poczynawszy od podstawowych technik laboratoryjnych poprzez techniki immunochemiczne aż po wyrafinowane techniki z zakresu biologii molekularnej. Starannie wyznaczyła sobie cele badawcze i w pełni je osiągnęła. Na uznanie zasługuje obszerność, czasochłonność oraz bardzo widoczna etapowość zaplanowanych badań. Opublikowana część wyników w pracach wieloautorskich wskazują na umiejętności Doktorantki współpracy w zespołach badawczych, co niewątpliwie świadczy o Jej dojrzałości naukowej. W skład całkowitego dorobku naukowego Doktorantki wchodzi 7 artykułów w indeksowanych czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, 4 rozdziały w książce oraz udział w 36 konferencjach naukowych o zasięgu międzynarodowym i krajowym. Należy również

wspomnieć, że mgr Karolina Gajda swoje doświadczenie naukowe wzbogaciła o badania w ramach realizacji trzech programów stypendialnych.

Podsumowując, w oparciu o ocenę przedstawionej rozprawy doktorskiej oraz dorobku naukowego stwierdzam, że mgr Karolina Gajda spełnia wymogi dotyczące ubiegania się o nadanie stopnia doktora określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.). Wnoszę zatem do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr Karoliny Gajdy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedra Biochemii Klinicznej

dr hab. Marek Foksiński, prof. UMK