

dr hab. n. med. Magdalena Izdebska, prof. UMK
Katedra Histologii i Embriologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

Bydgoszcz, dn. 18.05.2020 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Justyny Kutkowskiej
pt. „Molekularny mechanizm śmierci komórek niedrobnokomórkowego raka płuca oraz
raka trzustki traktowanych kombinacją sorafenibu i kwasu betulinowego”**

Przedstawiona do oceny praca doktorska opracowana została na podstawie powiązanego tematycznie cyklu trzech publikacji naukowych o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF wynoszącym 9,338. Rozprawa porusza niezwykle ciekawe i ważne zagadnienia dotyczące możliwości zastosowania skojarzonej terapii przeciwnowotworowej w odniesieniu do raka płuca oraz trzustki.

Choroby nowotworowe klasyfikuje się na drugim miejscu przyczyn zgonów w Polsce. Zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet niedrobnokomórkowy rak płuca jest główną przyczyną śmierci spowodowanej chorobą nowotworową. Niestety wzrasta również liczba zgonów z powodu raka trzustki. Te niechlubne statystyki związane są najczęściej ze zbyt późną diagnozą, która spowodowana jest bezobjawowym przebiegiem początkowych stadiów choroby. Dodatkowo leczenie NSCLC i PDAC jest trudne ze względu na częste występowanie lekooporności komórek nowotworowych na działanie stosowanych cytostatyków. A zatem badania podjęte przez Doktorantkę mają niezwykle istotne znaczenie w przedstawieniu synergicznego wpływu kombinacji inhibitora kinaz (sorafenib) ze związkami pochodzenia naturalnego (kwas betulinowy) na przebieg szlaków sygnałowych m.in. MAPK czy PI3K/Akt, a także ograniczenie proliferacji i indukcję apoptozy komórek raka płuca i trzustki. Dodatkowo przedstawione wyniki doświadczeń mogą przyczynić się do opracowania skuteczniejszych metod leczenia w/w nowotworów, a zastosowanie związków naturalnych obniżyć dawki oraz zminimalizować skutki uboczne użytych w terapii cytostatyków.

W skład ocenianej rozprawy doktorskiej wchodzi trzypublikacje (jedna przeglądowa, dwie oryginalne) o charakterze współautorskim. We wszystkich pracach mgr inż. Justyna Kutkowska jest pierwszym autorem, a załączone informacje o wkładzie autorskim

PAN - Instytut Immunologii	
Wpł. dnia	21-05-2020
L. dz.	609

w powstawanie prac, wskazują na istotną rolę Doktorantki w przedstawionym do oceny cyklu publikacji pod kierunkiem Panadr hab. Andrzeja Rapaka. Poddane ocenie prace zostały opublikowane w czasopismach recenzowanych o zasięgu międzynarodowym, posiadających współczynnik oddziaływania ImpactFactor: Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (2017 r.; IF=0,783), Cancer Science (2017 r.; IF=4,372), International Journal of Molecular Sciences (2018 r.; IF=4,183).

Z cyklu trzech prac, pierwsza, przeglądowa, opublikowana w Postępkach Higieny i Medycyny Doświadczalnej (2017) pt.: „Niedrobnokomórkowy rak płuca- mutacje, celowane i skojarzone terapie”, stanowi doskonały wstęp teoretyczny do podjętych w kolejnych pracach badań naukowych. Celem Doktorantki było przedstawienie molekularnego podłoża NSCLC związanego z mutacjami w cząsteczkach będących elementami szlaków przekazywania sygnałów w komórce, a także uczestniczącymi w procesie apoptozy i reakcjach zapalnych. Dodatkowo omówione zostały metody leczenia oraz możliwości opracowania zaawansowanych terapii opartych na charakterystyce molekularnej NSCLC. Badania genetyki komórek niedrobnokomórkowego raka płuca wskazują na liczne mutacje, których poznanie może mieć znaczenie, nie tylko rokownicze, ale również umożliwić opracowanie celowanych monoterapii. W trzeciej części pracy poglądowej autorzy omówili zalety terapii skojarzonej, która może wpływać na wiele procesów jednocześnie (prolifracja, różnicowanie, apoptoza, angiogeneza), minimalizować stężenia stosowanych związków oraz ograniczać lekooporność.

Drugą pracą z cyklu pt.: „Synergistic activity of sorafenib and betulinic acid against clonogenic activity of non-small cell lung cancer cells” opublikowano w Cancer Science (2017) i dotyczyła molekularnego mechanizmu współdziałania sorafenibu i kwasu betulinowego na proces śmierci komórek raka płuca. Materiał badawczy stanowiły linie komórkowe niedrobnokomórkowego raka płuca posiadające różne mutacje genu KRAS (A549, A427 i H385). Dodatkowo w celu określenia toksyczności stosowanych związków na komórki zdrowe zastosowano prawidłowe komórki krwi obwodowej. Metody badawcze zastosowane w publikacji obejmowały ocenę żywotności, poziomu proliferacji i indukcję apoptozy w komórkach traktowanych sorafenibem, kwasem betulinowym oraz kombinacją tych związków. Analizowano również poziom białek m.in. CHOP, pro- i antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2, kaspaz, PARP, Akt (p-AKT), mTOR (p-mTOR) czy ERK1/2 (p-ERK1/2). Ważnym elementem doświadczeń był także test potencjału klonogenego komórek. Ujęte w publikacji badania wykazały, że skoniugowane traktowanie komórek sorafenibem (1,3 µg/mL) i kwasem betulinowym (3 µg/mL) znacznie i istotnie statystycznie obniża żywotność

i proliferację komórek wszystkich linii komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuca. Ponadto po zastosowaniu kombinacji w/w związków rośnie odsetek komórek apoptotycznych. Analiza białek uczestniczących w szlakach przekazywania sygnałów wskazuje na wzrost poziomu proapoptotycznego białka CHOP oraz Bax i obniżenie ilości antyapoptotycznego Bcl-2. Potwierdzeniem indukowanej przez sorafenib i kwas betulinowy apoptozy jest również aktywacja kaspazy-8 i -9 oraz trawienie białka PARP. Z kolei obniżenie potencjału proliferacyjnego komórek może być powiązane z zahamowaniem aktywności lub fosforylacji kinaz Akt i mTOR. W pracy przeprowadzono również test aktywności klonogennej, którego wyniki wskazują na znaczne obniżenie potencjału do tworzenia kolonii komórek linii A549, H358 oraz A427 traktowanych sorafenibem i kwasem betulinowym w terapii skojarzonej w porównaniu do komórek inkubowanych każdym z tych związków osobno. Podsumowując zaprezentowane w tej publikacji wyniki badań wskazują, że zastosowanie sorafenibu lub kwasu betulinowego w monoterapii nie wpływa cytotoksycznie na komórki niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549, H358 oraz A427. Z kolei traktowanie komórek w/w linii dwoma związkami jednocześnie wykazuje synergiczny, antyproliferacyjny, proapoptotyczny efekt oraz silnie obniża potencjał klonogeny. Ponadto kombinacja użytych związków nie wykazuje toksyczności wobec prawidłowych komórek krwi obwodowej.

Badania ujęte w trzeciej i ostatniej pracy pt. „Sorafenib in combination with betulinic acid synergistically induces cell cycle arrest and inhibits clonogenic activity in pancreatic ductal adenocarcinoma cells” zostały opublikowane w *Int. J. Mol. Sci.*(2018), a materiał badawczy stanowiły linie komórkowe raka trzustki AsPC-1, Capan-1 i BxPC-3, które traktowane były sorafenibem (AsPC-1, Capan-1 (5 μ M); BxPC-3(3 μ M)), kwasem betulinowym (6 μ M) oraz kombinacją tych związków. W toku zaprezentowanych badań analizowano wpływ w/w związków na żywotność i proliferację komórek badanych linii, a także oceniano odsetek komórek apoptotycznych, rozkład faz cyklu komórkowego, potencjał klonogeny oraz poziom białek zaangażowanych w szlaki przekazywania sygnału. Uzyskane wyniki wykazały znaczne obniżenie żywotności i proliferacji komórek wszystkich linii komórkowych po zastosowaniu kombinacji sorafenibu i kwasu betulinowego. Otrzymane dane korelują z zahamowaniem cyklu komórkowego w fazie G2, a także wzrostem poziomu białka p21 i spadkiem c-Myc oraz cykliny D1. Ponadto użyte związki synergicznie hamują przebieg szlaków PI3K/Akt i MAPK, poprzez wpływ na obniżenie poziomu elementów tych procesów m.in. p-ERK 1/2 i p-Akt. Co ciekawe, ani w monoterapii, ani w terapii skojarzonej sorafenib i kwas betulinowy nie indukują apoptozy w komórkach raka trzustki, jednak, co

bardzo istotne, obniżają potencjał klonogeny komórek linii AsPC-1, Capan-1 i BxPC-3. Należy również wspomnieć, że autorzy pracy jako pierwsi wykazali możliwość zastosowania sorafenibu i kwasu betulinowego w terapii skojarzonej, która wpływa na obniżenie żywotności, proliferacji i zdolności do tworzenia kolonii komórek raka trzustki. Dodatkowo kombinacja w/w związków hamuje cykl komórkowy w fazie G2 oraz fosforylację kinazy Akt i ERK1/2.

Dodatkowym atutem przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej jest rozdział przedstawiający nieopublikowane jeszcze wyniki badań, które przeprowadzone zostały na pierwotnych liniach nowotworu płuca. Uzyskane dane wskazują, że zastosowanie w leczeniu zaawansowanego raka płuca kombinacji sorafenibu i kwasu betulinowego może wpłynąć na obniżenie żywotności komórek równie skutecznie, jak po podaniu powszechnie stosowanych cytostatyków (gemcytabina, pemetreksedem), a tym samym zminimalizować niepożądane skutki chemioterapii. Ponadto rozdział ten zawiera również dane określające wpływ kwasu betulinowego oraz betuliny na linie komórkowe niedrobnokomórkowego raka płuca w warunkach hipoksji i normoksji. W toku zaprezentowanych badań wykazano, że oba związki indukują apoptozę w komórkach linii A549 i H358 w warunkach hipoksji. Dodatkowo kwas betulinowy obniżał potencjał klonogeny komórek NSCLC w warunkach niedoboru tlenu, co może stanowić nową strategię leczenia guzów litych. Powyższe dane zostały ujęte w publikacji wysłanej do redakcji czasopisma Scientific Reports.

Biorąc pod uwagę wyniki uzyskanych badań, które były podstawą do napisania publikacji przedstawionych jako cykl prac w ramach rozprawy doktorskiej oraz jeszcze nieopublikowane dane zaprezentowane w rozdziale 7 pracy, można z całą pewnością stwierdzić, że mają one szczególny charakter poznawczy i wpisują się w aktualny nurt badań w zakresie biologii medycznej. Co więcej, poprzez opublikowanie ich w recenzowanych czasopismach naukowych posiadających współczynnik oddziaływania IF daje podstawę do uzyskania przez Panią mgr inż. Justynę Kutkowską stopnia doktora.

Pod względem formalnym rozprawa doktorska nie budzi zastrzeżeń i przygotowana jest w sposób przejrzysty i szczegółowy. Obejmuje spis treści, w którym zamieszczone są następujące rozdziały: Lista prac wchodzących w skład rozprawy, Lista pozostałych prac i patentów niewchodzących w skład rozprawy, Otrzymane stypendia oraz udział w projektach badawczych, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wprowadzenie ze szczegółowym opisem problemu badawczego, metodyki, celów naukowych oraz prac wchodzących w skład rozprawy, Omówienie dalszych nieopublikowanych badań związanych z zaprezentowanym osiągnięciem naukowym, Podsumowanie osiągnięcia naukowego, Literatura, Oświadczenia o

udziale procentowym autorów w realizacji poszczególnych prac oraz Prace wchodzące w skład rozprawy. Praca napisana jest poprawną polszczyzną. Użyte w tekście środki językowe są zgodne z panującymi normami leksykalnymi oraz stylistycznymi. Drobne uchybienia stylistyczne, gramatyczne czy natury redaktorskiej nie wpływają na wysoką wartość merytoryczną pracy.

Z przedstawionego do oceny cyklu prac, komentarzy do ich treści, a także załączonych oświadczeń o zakresie udziału w ich powstawaniu jednoznacznie wynika, że Doktorantka potrafi sformułować i rozwiązać problem naukowy, dobrze dobrać techniki badawcze, a także umiejętnie przeprowadzić dyskusję swoich wyników z wynikami innych grup badawczych. Pani mgr inż. Justyna Kutkowska dowiodła w sposób spójny, że konsekwentnie nabywa zdolność do prowadzenia samodzielnych badań naukowych, i że potrafi pracować w zespole naukowym czego dowodem jest udział w licznych grantach NCN i NCBR jako wykonawca, zgłoszenie patentowe, a także otrzymane stypendia.

W mojej opinii prezentowana rozprawa doktorska pełni spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 z późn. zm.). Uznaję ją również za wysoce poznawczą w dziedzinie biologii medycznej i oceniam wyróżniająco. Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu dopuszczenie mgr inż. Justyny Kutkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W związku z wysoką wartością naukową pracy wnoszę również o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Małgorzata Kłebek