



**WOJSKOWY INSTYTUT
HIGIENY I EPIDEMIOLOGII**
ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa



WOJSKOWY INSTYTUT HIGIENY I EPIDEMIOLOGII
im. gen. Karola Kaczkowskiego
01-163 Warszawa, ul. Kozielska 4
tel. 261 853 101, fax 261 853 133
e-mail: kancelaria.jawna@wihe.pl



Warszawa, 26 czerwca 2023 r.

dr hab. n. med. inż. Beata Pająk, EMBA, prof. WIHE
Samodzielna Pracownia Genetyki i Biologii Molekularnej
Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii
im. gen. K. Kaczkowskiego
ul. Kozielska 4
01-163 Warszawa

Ocena Rozprawy Doktorskiej
mgr Aleksandry Olszewskiej-Banach
pt.: „Rola autofagii i starzenia w chemooporności raka płuca: analiza *in vitro*, *in vivo* i
materiału klinicznego”,
wykonana zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Warszawskiego
Uniwersytetu Medycznego z dnia 07 czerwca 2023 r.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Aleksandry Olszewskiej-Banach została napisana w języku polskim i przedstawiona do recenzji w postaci wydruku na 178 stronach. Układ dysertacji jest tradycyjny i zawiera wszystkie wymagane rozdziały w tym jednobrzmiące streszczenia w języku polskim i angielskim, spis treści, wykaz stosowanych skrótów, spis rycin i tabel, wstęp, cel badań, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz wykaz piśmiennictwa. Rozprawa zawiera 7 tabel, 48 rycin oraz 333 pozycje piśmiennictwa, z czego znakomita większość pochodzi z ostatnich 10 lat. Do pracy dołączono także dokumentację Komisji Bioetycznej oraz Etycznej, zawierającą zgodę na przeprowadzenie badań na zwierzętach oraz z wykorzystaniem materiału klinicznego, pozyskanego od pacjentów z nowotworem płuc. Badania prowadzone przez Doktorantkę były finansowane w ramach projektu badawczego Sonata Bis z Narodowego Centrum Nauki, którego kierownikiem jest dr Halina Waś, będąca promotorem pomocniczym w niniejszym przewodzie doktorskim. Część wyników zawartych w rozprawie była opublikowana w recenzowanym czasopiśmie *Frontiers in Oncology* a Doktorantka jest pierwszym autorem publikacji.

Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy znaczenia procesów autofagii oraz starzenia w oporności komórek nowotworowych raka płuc na chemioterapię. Doktorantka podjęła się weryfikacji założeń pracy na kilku modelach, w tym komórkowym dwóch linii komórkowych reprezentujących nowotwór płuc, zwierzęcym syngenicznym modelu raka płuc oraz na

próbkach guzów pobranych od pacjentów z nowotworem płuc. Poruszane przez Doktorantkę zagadnienia są ważne, gdyż dotychczas nie ustalono jednoznacznie znaczenia zjawiska starzenia dla rozwoju nowotworów, odpowiedzi na leczenie i udziału w mechanizmach przerzutowania. Współistnienie zjawiska starzenia wraz z innymi procesami komórkowymi, jak autofagia, apoptoza i inne, sprawia, iż zadanie to jest ambitne i wymaga przemyślanego toku prac badawczych, które wszechstronnie analizuje procesy zachodzące w odpowiedzi na działanie badanych czynników. Ponadto, wprowadzenie do modelu badawczego parametru zróżnicowanej dostępności tlenu, dodatkowo komplikuje horyzont obserwacji. Być może z tego względu opisywane zjawiska są trudne do precyzyjnego uporządkowania a badania w tym zakresie wysoce pożądane. Podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza jest bardzo aktualna a wyniki z zaplanowanych badań mogą mieć istotny charakter poznawczy.

Wstęp pracy wprowadza czytelnika w tematykę nowotworów płuc, obecnego standardu terapii oraz nowych kierunków terapii, w tym immunoterapii, terapii celowanej oraz innych procedur medycznych rozwijanych w powyższym wskazaniu. Następnie Doktorantka opisuje procesy starzenia się komórek i szlaków molekularnych zaangażowanych w regulację tego procesu, sposób jego identyfikacji, wreszcie znaczenia starzenia komórek w kontekście terapii przeciwnowotworowej. W kolejnych akapitach Doktorantka charakteryzuje proces autofagii (a właściwie proces makroautofagii) oraz znaczenie hipoksji dla rozwoju nowotworu i jego odpowiedzi na chemioterapię. Cały rozdział wzbogacają estetyczne ilustracje, które schematycznie obrazują opisywane złożone szlaki sygnałowe, umożliwiając czytelnikowi ich lepsze rozumienie. Wstęp jest napisany płynnie i logicznie uszczegóławia opisywane zjawiska. Towarzyszą mu jednak liczne błędy interpunkcyjne i niezręczności stylistyczne, jak np. sformułowania: „...pacjenci, którzy nie reagują na operację...” (str. 18), „Większość pacjentów to kandydaci niechirurgiczni...” (str. 19), „Okolo 40% pacjentów jest w stadium IV...” (str. 19), „Niektóre geny, które mają rolę w wpływie leków...” (str. 45) i inne. Należałoby także unikać w tekstach naukowych sformułowań typu „ten, ta, to”, które bywają mylące lub wymuszają powrót do wcześniejszych treści a odwoływać się precyzyjnie do opisywanych zjawisk. W moim przekonaniu zabrakło także we Wstępie podsumowania, które syntetycznie wskazywałoby na najważniejsze dla Doktorantki elementy opisywanych zjawisk i uzasadnienie podjętych badań wraz z hipotezą badawczą.

We Wstępie Doktorantka wspomina, iż stare komórki tworzą z sąsiadującymi komórkami mostki cytoplazmatyczne, zapewniające między sobą bezpośredni transfer białek (str. 28). Czy Doktorantka mogłaby szerzej omówić to zjawisko. Czy występuje ono także w warunkach fizjologicznych i jakie białka są przekazywane? Jakie jest znaczenie tego zjawiska w procesach patologicznych? Prosiłabym także o doprecyzowanie jakie terapie senolityczne ma Doktorantka na myśli, pisząc iż mogą one zapobiegać lub opóźniać proces związanych z wiekiem dysfunkcji tkanek (str. 23).

Następnie Doktorantka formułuje 6 celów pracy, które dotyczą: określania dawek badanych leków indukujących starzenie się komórek raka płuc, ocenie znaczenia hipoksji dla procesów starzenia komórek i tranzycji epithelialno-mezenchymalnej, oraz nabywania fenotypu macierzystego, a także określenia znaczenia modulacji aktywności enzymu LDHA i procesu autofagii w starzeniu komórkowym. Doktorantka zaplanowała także weryfikację obserwacji w

modelu zwierzęcym oraz ocenę markerów molekularnych hipoksji i starzenia w materiale klinicznym raka płuc.

Do realizacji celów badawczych Doktorantka wykorzystała wszechstronny zakres metod badawczych, opartych na analizach biochemicznych i z zakresu biologii molekularnej (hodowle komórkowe, wyciszanie genów, cytometria przepływowa, analizy Western blot, rtPCR, sekwencjonowanie NGS, testy biochemiczne żywotności, proliferacji, ocena autofagii oraz inne). Wyniki analizowano statystycznie z wykorzystaniem programu GraphPad Prism. Poszczególne procedury eksperymentalne i potrzebne do nich materiały oraz odczynniki zostały opisane w sposób wyczerpujący i nie budzą zastrzeżeń. Aby ocenić wpływ warunków hipoksji na analizowane parametry, Doktorantka prowadziła hodowlę w komorze hipoksyjnej i porównywała otrzymane wyniki z hodowlą w warunkach normoksji. W rozdziale Materiały i Metody zawarto także opis ogólnego schematu eksperymentu (str. 51), który był modyfikowany w zależności od wykonywanych analiz. Doktorantka powinna w tej sekcji zawrzeć pełen opis schematów badawczych i ich modyfikacji, które niepotrzebnie są opisywane w rozdziale Wyniki. Doktorantka opisując schemat badawczy wspomina także, iż wzorując się na schemacie podawania chemioterapii pacjentom, przeprowadzono długotrwałe eksperymenty, w których komórki ludzkiego raka płuc poddano działaniu chemioterapeutyków – cisplatyny, docetaxelu oraz winorelbiny. Jednakże, jak wynika z opisu na str. 66, działanie badanych cytostatyków trwało jedynie 24 h, zatem sformułowanie o długotrwałym ich oddziaływaniu jest niefortunne. Doktorantka wspomina także, iż docelowo badane substancje były rozcieńczane w medium hipoksyjnym, jednakże w opisie hodowli komórkowych nie ma informacji czym jest medium hipoksyjne i w jakim zakresie jego skład jest odmienny od medium stosowanego w hodowli w warunkach normoksji.

Poprosiłabym także Doktorantkę o doprecyzowanie informacji na temat sporządzania roztworu macierzystego cisplatyny, która jak wynika z opisu na str. 51, była rozpuszczana w PBS do stężenia 7,5 mM (czyli około 2,25 mg/ml). Jak wynika z dostępnych informacji także na stronie Sigma, gdzie zakupiono odczynnik, cisplatyna ma ograniczoną rozpuszczalność w PBS, i tylko w PBS z zawartością NaCl, do 1 mg/ml, podczas gdy rozpuszczalność w DMSO jest do 10 mg/ml.

Rozdział Wyniki przedstawia w logiczny, usystematyzowany sposób zebrane obserwacje, które ilustrują liczne wykresy i zdjęcia. Jakość zawartych Rycin jest wysoka i nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka zgodnie ze sformułowanymi celami pracy weryfikowała kolejne założenia, krótko podsumowując każdą z najważniejszych obserwacji. Ze względu na złożoność modelu eksperymentalnego, taka forma opisu pozwala na akcentowanie najważniejszych spostrzeżeń i nawiguje czytelnika wśród licznych wyników. Podobnie jak we Wstępie, w tekście pojawiają się usterki interpunkcyjne i stylistyczne oraz kilka sformułowań które są niefortunne, jak np.: leczenie komórek/terapia CIS (jednak w badaniach in vitro mówi się o traktowaniu komórek lub oddziaływaniu na komórki), spadki aktywności/akumulacji (raczej zmniejszenie/hamowanie aktywności), macierzystość komórek (raczej fenotyp macierzysty). Także w kilku miejscach rozdziału Wyniki znajdują odwołania do obserwacji innych autorów, dotyczące raka okrężnicy (str. 74, 85), które powinny być umieszczone w Dyskusji pracy doktorskiej. Odnosząc się natomiast do zakresu merytorycznego wyników,

moim zdaniem w prezentacji obserwacji współdziałania CIS + HCQ (Ryc. 4.21-4.27), powinny być także zawarte obserwacje dla komórek kontrolnych, nietraktowanych oraz traktowanych tylko HCQ. Wiadomo bowiem, iż sama HCQ wpływa na zmiany markerów autofagii (jak MAP-LC3) i nie można wykluczyć jej udziału w obserwowanych zmianach ekspresji innych białek. Zmiany ekspresji mogą także być odpowiedzią na niedotlenienie i mieć wpływ na reakcję komórek na dodatkową obecność cisplatyny. Z kolei, przy prezentacji wyników Western blot i oznaczaniu form fosforylowanych, powinna być zawarta informacja, jaka pozycja białka jest fosforylowana (np. p-cdc-2, p-S6), a wśród wykrywanych białek, oznaczana także forma całkowita (Ryc. 4.12, 4.17, 4.24). W przypadku aktywacji kinazy mTOR, zaangażowanej w indukcję autofagii, także jej status fosforylacji powinien być analizowany (Ryc. 4.17).

Analiza NGS jest ciekawą częścią prezentowanych wyników, gdyż pozwala na uzyskanie szerszego obrazu zmian wewnątrzkomórkowych pod wpływem oddziaływania CIS i CIS + HCQ. Analiza bioinformatyczna pozwoliła na wskazanie grup genów, które ulegają hamowaniu/aktywacji pod wpływem oddziaływania badanych cząsteczek w warunkach hipoksji/normoksji. Ważnym wnioskiem z przeprowadzonej analizy jest spójność analiz NGS zmian genów cyklu komórkowego, replikacji i naprawy DNA po traktowaniu HCQ z wynikami badań *in vitro*, co uwiarygadnia dodatkowo przedstawione przez Doktorantkę obserwacje.

Doktorantka podjęła próbę oceny znaczenia hamowania autofagii z użyciem HCQ w modelu *in vivo* raka płuc myszy traktowanych cisplatyną. Doktorantka wskazuje jednak na konieczność przerwania doświadczeń, ze względów etycznych. Badania na modelach zwierzęcych są obarczone dużym ryzykiem i często wymagają optymalizacji w zakresie schematu badawczego. Należy w tym miejscu docenić uczciwość Doktorantki i zawarcie tej części badań w pracy doktorskiej, mimo, iż nie udało się ich przeprowadzić zgodnie z założeniami. Poprosiłabym jednak Doktorantkę o komentarz, z jakich względów zaplanowano podawanie HCQ dopiero po 3 tygodniach podawania cisplatyny? Czy w przyszłych pracach nie należałoby rozważyć jednoczesnego podawania HCQ z CIS od początku traktowania zwierząt, oraz uwzględnić grupy otrzymujące tylko CIS i HCQ?

W ostatniej sekcji Wyników, Doktorantka weryfikuje obecność markerów hipoksji, które jak wynikało z badań *in vitro*, modulują odpowiedź komórek na cisplatynę. Doktorantka wykazała, iż w wycinkach raka płuc pacjentów, identyfikuje się zmiany ekspresji HIF-1, HIF-2 oraz markerów fenotypu macierzystego komórek (ALDH1A, NANOG oraz OCT-3/4). Wydaje się jednak, iż bez informacji na temat leczenia pacjentów w kontekście cisplatyny i weryfikacji wyników w obrębie wycinków pobranych od pacjentów leczonych/nieleczonych cisplatyną, wnioskowanie o istotności obserwowanych zmian ekspresji w kontekście prognozowania odpowiedzi na chemioterapię lekami platynowymi, jest przedwczesne.

Dyskusja jest mocną stroną przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej. W sposób zręczny Doktorantka konfrontuje swoje obserwacje z wynikami innych autorów. Wskazuje także, na elementy które wymagają dalszej analizy i pozostają niejednoznaczne. Liczba cytowań bieżącej literatury wskazuje na biegłość Doktorantki w opisywanej tematyce badawczej oraz gruntowne zrozumienie złożoności opisywanych zjawisk. Moja uwaga krytyczna dotyczy jedynie zawarcia na początku Dyskusji (str. 113) sześciu sformułowanych w postaci podpunktów wniosków z przeprowadzonych badań, które powinny zostać zawarte w

rozdziale Wnioski, który z kolei w swoim opisowym charakterze nie daje jasnego obrazu, które z postawionych celów zostały zrealizowane i jakie efekty udało się uzyskać. Jak wynika z wniosków zawartych w Dyskusji, hipoksja korelowała z opornością komórek raka płuc na chemioterapię czemu towarzyszyło zjawisko ucieczki przed starzeniem regulowane przez szlak zależny od białek p53/p21. Ponadto, hamowanie procesu autofagii zmniejszało ucieczkę przed starzeniem zwiększając efekt cytotoksyczny cisplatyny oraz modulowało ekspresję białek fenotypu macierzystego komórek.

Podsumowując, należy stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne opracowanie istotnego problemu badawczego jakim jest znaczenie procesów starzenia w odpowiedzi komórek nowotworowych na chemioterapię. Doktorantka realizowała badania na modelach raka płuc, ale należy zauważyć iż opisywane zależności molekularne pomiędzy starzeniem komórek, autofagią i oddziaływaniem warunków niedotlenienia, mogą mieć charakter uniwersalny. Doktorantka wykorzystała szeroki wachlarz modeli badawczych oraz technik eksperymentalnych by zrealizować postawione cele badawcze. Zawarte w recenzji uwagi krytyczne nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Dlatego stwierdzam, iż recenzowana rozprawa doktorska mgr Aleksandry Olszewskiej-Banach spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Aleksandry Olszewskiej-Banach do dalszych etapów przewodu doktorskiego.