

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr Aleksandry Olszewskiej-Banach
pod tytułem
„Rola autofagii i starzenia w chemooporności
raka płuca: analiza *in vitro*, *in vivo* i materiału klinicznego”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Aleksandry Olszewskiej-Banach została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Claudine Kieda oraz z udziałem promotora pomocniczego Pani dr Haliny Waś w Laboratorium Onkologii Molekularnej i Terapii Innowacyjnych Wojskowego Instytutu Medycznego Państwowego Instytutu Badawczego. Badania prezentowane w rozprawie były finansowane w ramach projektu badawczego Sonata Bis 7 numer 2017/26/E/NZ3/00434 Narodowego Centrum Nauki, którego kierownikiem była Pani dr Halina Waś.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy charakterystyki molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za adaptację komórek niedrobnokomórkowego raku płuca poddanych działaniu chemioterapeutyków, a także oceny skutków niedotlenienia oraz poznania znaczenia roli metabolizmu beztlenowego i autofagii w progresji tego nowotworu. Należy zaznaczyć, że pomimo wielu prac naukowych poświęconych niedrobnokomórkowemu rakowi płuca (>10 000 publikacji w bazie PubMed) mechanizmy leżące u podłoża lekooporności, progresji oraz przerzutów tego nowotworu są wciąż stosunkowo słabo poznane. Istniejące wyniki wciąż rodzą więcej pytań niż przynoszą jednoznacznych odpowiedzi. Problem podjęty przez Doktorantkę jest tym istotniejszy, że według American Cancer Society szacuje się, iż 80 - 85% diagnozowanych przypadków nowotworów raka płuc to rak niedrobnokomórkowy. Problem jest istotny, tym bardziej z punktu klinicystki, ponieważ przeżycie 5-letnie ściśle zależy od stopnia zaawansowania TNM (ang. Tumor, Nodus, Metastases) i waha się odpowiednio dla I stopnia – od 60% do 70%, II stopnia – od 40% do 50%, IIIa stopnia – spada poniżej 15% a IIIb i IV stopnia wynosi zaledwie 1%. Dlatego tak ważne jest poszukiwanie nowych efektywnych strategii terapeutycznych pozwalających skutecznie eliminować komórki nowotworowe oraz ograniczać ich przerzutowanie.

Doktorantka w swojej pracy skoncentrowała się w szczególności na procesie starzenia indukowanego terapeutykami (ang. Therapy-Induced Senescence -TIS) oraz czynnikach

modulujących ten proces i związanych ze stężeniem tlenu oraz dostępnością składników odżywczych.

Zgodnie z powyższym należy stwierdzić, że tematyka pracy doktorskiej jest aktualna, interesująca oraz mająca uzasadnienie w odniesieniu do wcześniejszych publikacji naukowych.

Rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Olszewskiej-Banach ma charakter monografii i liczy 177 numerowanych stron. Układ pracy doktorskiej jest typowy dla prac eksperymentalnych. Praca doktorska została podzielona na następujące rozdziały: streszczenie pracy przygotowane w języku polskim oraz angielskim, wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, bibliografia, opinia Komisji Bioetycznej, opinia Komisji Etycznej. Tekst pracy poprzedzony został spisem treści, spisem rycin i tabel oraz wykazem skrótów.

Bibliografia obejmuje 333 odpowiednio dobrane zgodnie z tematem pracy pozycje literatury. Praca doktorska została także wzbogacona w 48 rycin oraz 7 tabel.

W zakresie oceny formalnej pracy doktorskiej recenzent ma tylko kilka uwag. Tytuły tabeli zwyczajowo powinny być umieszczone nad tabelą, pod tabelą natomiast umieszcza się dodatkowe informacje, np. dotyczące użytych testów statystycznych, wyjaśnienia zastosowanych symboli, itp.

W pracy zauważono także kilka błędów związanych z brakiem interpunkcji oraz omyłek edytorskich czy niefortunnych sformułowań, co jednak zdaniem recenzenta może zdarzyć się przy tak obszernej pracy. Recenzent nie chce w tym miejscu ich wymieniać, ponieważ nie mają one większego znaczenia dla zrozumienia tekstu oraz wyników. Należy jednak wspomnieć o błędnie przetłumaczonej nazwie inhibitora autofagii. Doktorantka przetłumaczyła z języka angielskiego hydroxychloroquine (stosowany skrót w pracy HCQ) jako hydroksychlorokinę. Należy jednak zaznaczyć prawidłowe nazewnictwo w języku polskim tego inhibitora to hydroksychlorochina, ponieważ jest to pochodna chininy.

Doktorantka często stosuje w pracy także określenie „*leczone komórki*”, które zdaniem recenzenta nie do końca jest uprawione w odniesieniu do komórek linii nowotworowej hodowanych *in vitro*, bardziej wskazane byłoby użycie terminu *traktowane* lub *poddane działaniu* itp.

Innym błędem jest również niekonsekwentne zapisywanie nazw genów zgodnie z przyjętymi standardami. Geny powinny być zapisane odpowiednio z użyciem kursywy.

Niezależnie od powyższego, na podkreślenie zasługuje fakt, że część wyników i danych zaprezentowanych w tej pracy została już opublikowana w 2022 roku z pierwszym autorstwem doktorantki w czasopiśmie z listy JCR Frontiers in Oncology (*Olszewska A, Borkowska A, Granica M, Karolczak J, Zglinicki B, Kieda C, Was H. Escape From Cisplatin-Induced Senescence of Hypoxic Lung Cancer Cells Can Be Overcome by Hydroxychloroquine. Front Oncol. 2022 Jan 21;11:738385. doi: 10.3389/fonc.2021.738385. eCollection 2021*).

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

We wstępie pracy zawarto wszystkie niezbędne informacje wprowadzające czytelnika w zagadnienia poruszane w rozprawie doktorskiej. W oparciu o adekwatną do tematyki literaturę, Doktorantka dokonała opisu aktualnego stanu wiedzy dotyczącego m.in. epidemiologii i klasyfikacji nowotworów raka płuca, charakterystyki drobnokomórkowego oraz niedrobnokomórkowego raka płuca, przegląd stosowanych terapii u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca, mechanizmów odpowiedzialnych za starzenie komórkowe, w tym w szczególności odpowiedzialnych za starzenie indukowane terapeutykami, znaczenia poliploidii w występowaniu oporności na zastosowane leczenie, mechanizmów odpowiedzialnych za przerzuty związane z tzw. fenotypem macierzystym, tranzycją epithelialno-mezenchymalną. We wstępie Doktorantka opisała również mechanizmy molekularne kontrolujące proces autofagii oraz hipoksji, koncentrując się na znaczeniu tych procesów w rozwoju i progresji nowotworu. Wstęp został wzbogacony także w dobrze opracowane schematy.

Oceniając ten rozdział pracy należy także podkreślić, że Doktorantka bardzo dobrze opisała we wstępie luki dotychczasowego stanu wiedzy w zakresie omawianej tematyki, jednocześnie uzasadniając potrzebę wykonania swojej pracy doktorskiej. Do tego rozdziału nie mam uwag.

Cel pracy została określony w sposób jednoznaczny zgodnie z tematem rozprawy. Dodatkowo Doktorantka sprecyzowała sześć celów szczegółowych. Do tej części również nie mam uwag.

Podsumowując powyższe stwierdzam, że postawiony cel naukowy spełnia wymóg niezbędny dla uznania ocenianej pracy doktorskiej za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się praca doktorska, ponieważ realizacja tego celu istotnie prowadzi do poszerzenia dotychczasowej wiedzy oraz stanowi przyczynek do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.

Rozdział materiały i metody został opracowany poprawnie. W rozdziale tym opisano wszystkie procedury eksperymentalne wykorzystane do osiągnięcia zdefiniowanych w pracy celów badawczych. W rozdziale materiały i metody zawarto opis procedur, który w większości bezproblemowo umożliwia odtworzenie wykonanych eksperymentów. Wskazane jednak byłoby podanie odpowiednich numerów katalogowych niektórych odczynników stosowanych w badaniach np. inhibitorów, siRNA, zestawów do oznaczeń i przeciwciał. Ma to istotne znaczenie, ponieważ jak Doktorantka na pewno wie na stronach firm może być dostępnych np. kilka przeciwciał dedykowanych do immunodetekcji określonego jednego typu białka. Podobnie wskazane byłoby podawanie numerów CAS w odniesieniu do stosowanych przez Doktorantkę inhibitorów, co np. pozwoliłoby jednoznacznie zidentyfikować użyty w badaniach związek.

W podrozdziale 3.2.2 Materiały i metody zatytułowanym „Ogólny schemat eksperymentalny” wskazane byłoby umieszczenie poglądowego schematu układu eksperymentalnego stosowanego przez Doktorantkę z zaznaczonymi etapami wykonanych procedur. Taki schemat znalazł się w rozdziale opisującym wyniki, niemniej zdaniem recenzenta trafniejsze byłoby jego zamieszczenie w rozdziale Materiały i metody.

Niezależnie od powyższego chciałbym podkreślić, że jakość merytoryczna oraz ilość zastosowanych technik oraz narzędzi eksperymentalnych świadczy o bardzo dobrym warsztacie Doktorantki. W pracy wykorzystano bowiem hodowle komórkowe *in vitro*, mysz model syngeniczny raka płuca oraz próbki kliniczne pozyskane od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Doktorantka uzyskała także odpowiednie zgody na pracę z materiałem zwierzęcym oraz ludzkim. W pracy wykorzystano takie procedury jak sekwencjonowanie następnej generacji, qPCR, technikę western blot, techniki mierzące aktywność metaboliczną komórek, proliferację oraz technikę wyciszanie genów z użyciem siRNA.

Prezentacja wyników została usystematyzowana w sposób tworzący logiczny ciąg zmierzający do udzielenia odpowiedzi na zdefiniowane w pracy doktorskiej cele. Wyniki przedstawiono na 39 rycinach oraz w 1 tabeli odpowiednio opisanych oraz zacytowanych w tekście. Rozdział ten został opracowany prawidłowo zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami dla prac eksperymentalnych. Każdy rozdział tej sekcji zawiera również podsumowanie dotyczące otrzymanych wyników, co systematyzuje omawiane wyniki. Rozdział Wyniki wskazuje również na ogrom pracy Doktorantki jaki został włożony w wykonanie

eksperymentów oraz dojrzałość Doktorantki jako naukowca. W tej sekcji zaprezentowano szereg ciekawych i nieoczywistych wyników, które istotnie poszerzają dotychczasową ogólną wiedzę na temat biologii komórek nowotworowych oraz starzenia komórkowego. Za szczególnie interesujące uważam wyniki dotyczące zastosowania hydroksychlorochiny oraz znaczenia hipoksji w modulacji procesu starzenia indukowanego chemioterapeutykami, np. cisplatyną. Doktorantka dowiodła bowiem, że skutecznym sposobem przezwyciężenia oporności wywołanej cisplatyną niedotlenionych komórek niedrobnokomórkowego raka płuca jest hamowanie autofagii przez zastosowanie hydroksychlorochiny.

Otrzymane wyniki zostały podane szczegółowej dyskusji w oparciu o adekwatną do problematyki literaturę w kolejnym rozdziale dysertacji. Należy jednocześnie zaznaczyć, że polemika Doktorantki z wcześniejszymi danymi została przeprowadzona w sposób dojrzały wskazując na bardzo dobrą znajomość tematyki.

Po przeczytaniu rozdziału wyniki oraz dyskusji mam pytania dotyczące doprecyzowania niektórych aspektów pracy.

- 1) W jaki sposób monitorowano proces reoksygenacji zachodzący po zakończonej hipoksji (np. przed każdym oznaczeniem)? Czy zdaniem Doktorantki hydroksychlorochina może uwrażliwiać komórki na reoksygenację?
- 2) Proszę o doprecyzowanie warunków normoksji i hipoksji w odniesieniu do podpisu ryciny 4.14.
- 3) Czym był podyktowany wybór czasowego wyciszenia ekspresji genów autofagicznych w komórkach raka płuca A549 traktowanych cisplatyną techniką siRNA zamiast stabilnego?
- 4) Czy Doktorantka sprawdzała i czy obserwowała efekt zmiany poziomu białek autofagicznych w przypadku stosowania siRNA negatywnego jako kontrolę w odniesieniu do komórek nietraktowanych kompleksami siRNA i lipofektaminy? Jakiego efektywnego stężenia lub ilości siRNA stosowano do wyciszenia wspomnianych genów i czy mieści się ono w rekomendowanym przez producenta przedziale? Doktorantka podała w metodyce, że roztwór wyjściowy siRNA był o stężeniu 20 mM, co zdaniem Recenzenta jest bardzo wysokim stężeniem siRNA rzadko oferowanym przez producentów. Czy przy zastosowanym stężeniu/ilości siRNA obserwowano toksyczność?

- 5) Dlaczego podczas prac eksperymentalnych nie monitorowano śmierci komórkowej specyficznymi markerami np. apoptozy, nekroptozy?
- 6) Jakiego efektu należy się spodziewać co do zmian w profilu sekrecyjnym cytokin w przypadku obniżenia poziomu ekspresji *HIF1a* w komórkach A549 traktowanych cisplatyną w hipoksji? Dlaczego Doktorantka nie zdecydowała się sprawdzić tego aspektu w odniesieniu do informacji podanych we wstępie pracy?
- 7) Co wiadomo o efektach ubocznych stosowania hydroksychlorochiny na komórki prawidłowe? Co wiadomo o biodostępności hydroksychlorochiny w organizmie? Jak to może mieć implikacje na wyniki prezentowane w rozdziale 4.8.

Niezależnie od moich pytań, jak już wspomniałem w recenzji, bardzo wysoko oceniam zaprezentowane wyniki.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu recenzji chciałbym stwierdzić, iż mimo moich uwag, bardzo wysoko oceniam przedstawioną pracę doktorską Pani mgr Aleksandry Olszewskiej-Banach oraz stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Doktorantka udowodniła, że samodzielnie potrafi rozwiązywać sformułowany problem naukowy poprzez odpowiednio zaplanowane eksperymenty, ich interpretację, krytyczną dyskusję oraz wyważone wnioski. Stwierdzam także, że oceniana przeze mnie praca doktorska wnosi nowe informacje do dyscypliny nauki medycznej. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Olszewskiej-Banach do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową wyników dotyczących zastosowania hydroksychlorochiny oraz znaczenia hipoksji w modulacji procesu starzenia indukowanego chemioterapeutykami, a także fakt, że częściowo zostały już opublikowane z pierwszym autorstwem Doktorantki w czasopiśmie z listy JCR Frontiers in Oncology wnioskuję do Rady Naukowej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Rzeszów, 10/07/2023

Dr hab. Maciej Wnuk, prof. UR