



Prof. dr hab. Anna Żaczek
Zakład Onkologii Translacyjnej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

Gdańsk 10.08.2023

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr Aleksandry Olszewskiej-Banach pt. „Rola autofagii i starzenia w chemooporności raka płuca: analiza *in vitro*, *in vivo* i materiału klinicznego” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Claudine Kieda (promotor) i dr Haliny Waś (promotor pomocniczy) w Laboratorium Onkologii Molekularnej i Terapii Innowacyjnych Wojskowego Instytutu Medycznego.

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy badania mało poznanej roli niedotlenienia w indukcji starzenia się komórek pod wpływem chemioterapii, w szczególności cisplatyny w niedrobnokomórkowym raku płuca. Chemioterapia wciąż pozostaje jedną z głównych metod leczenia raka płuca. Niestety jej efekty nie zawsze są zadowalające, często dochodzi do rozwoju oporności na zastosowanie leczenia. Jednym z mechanizmów leżących u podstaw oporności na terapię może być rozwój starzenia indukowanego terapią (TIS). Dlatego podjęcie tematu starzenia indukowanego terapią i wpływu na nie niedotlenienia uważam za jak najbardziej zasadne i ciekawe. Realizowane badania wpisują się w realizowaną od wielu lat z sukcesami tematykę zespołu kierowanego przez prof. Claudine Kieda. Zaplanowane i przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej analizy są aktualne i istotne z poznawczego punktu widzenia. Poszerzają wiedzę na temat starzenia komórkowego indukowanego chemioterapią w kontekście hipoksji, autofagii, jak również możliwości modulacji tego zjawiska odpowiednimi inhibitorami. Badania posiadają więc również potencjał aplikacyjny, mogący w przyszłości wpłynąć na skuteczniejszą chemioterapię lub odpowiedni dobór pacjentów do leczenia.

Oceniając stronę formalną pracy, rozprawę stanowi przygotowane w języku polskim opracowanie liczące 189 stron. Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich w zakresie nauk eksperymentalnych, choć w moim odczuciu praca mogłaby być krótsza. Praca obejmuje: spis treści, wykaz skrótów, streszczenie po angielsku i po polsku, wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, bibliografię oraz opinie komisji bioetycznej i etycznej. Z technicznego punktu widzenia rozprawa przygotowana jest bardzo starannie; tekst

jest napisany poprawną polszczyzną, błędów i literówek jest niewiele. Posiada czytelną oprawę graficzną i dobrze opracowane ryciny. Na docenienie zasługują starannie przygotowane schematy, jak również imponująca lista 333 pozycji literaturowych. Układ pracy jest logiczny i nie budzi zastrzeżeń, co dowodzi umiejętności Doktorantki do właściwego przedstawienia problemu naukowego i sposobu jego rozwiązania. Taka staranność dodatkowo utwierdza czytelnika w przekonaniu, iż same badania i analizy laboratoryjne przeprowadzone były w sposób zachowujący najwyższe standardy.

Przechodząc do oceny merytorycznej, pracę rozpoczyna rozbudowany 35-stronicowy **Wstęp**, szczegółowo przedstawiający analizowane w pracy zagadnienia, który dobrze wprowadza w tematykę badań, uzasadniając celowość ich podjęcia. Autorka omawia kolejno ogólną charakterystykę raka płuca, starzenie komórkowe, fenotyp macierzysty, EMT, autofagię, hipoksję i metabolizm beztlenowy. Rozdział ten świadczy o tym, że Doktorantka wykazuje się dobrą znajomością i zrozumieniem tematu oraz, że jest zorientowana w bieżącym piśmiennictwie naukowym.

Cel pracy określony jest jednoznacznie i wystarczająco. Głównym zamierzeniem badawczym było zbadanie wpływu niedotlenienia na wywołane terapią starzenie się komórek raka płuc, a także wpływu modulacji metabolizmu beztlenowego oraz autofagii na starzenie się komórek w tych warunkach. Zaplanowano kompleksowe badania *in vitro* na komórkach ludzkiego raka płuca A549 oraz mysiego raka płuca Lewisa LLC1 w warunkach normoksji i hipoksji, *in vivo* w mysim modelu syngenicznym raka płuca oraz z wykorzystaniem materiału klinicznego pochodzącego od chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuca.

Rozdział **Materiały i Metody** został przygotowany starannie i szczegółowo. Analiza wybranych zagadnień wymagała zastosowania szerokiego zakresu technik z zakresu biologii komórki i biologii molekularnej. Stosowane metody obejmowały min.: metody hodowli komórkowej w warunkach normoksji i hipoksji, wyciszanie genów metodą siRNA, analizy ekspresji genów na poziomie transkryptu (wykonane metodami RT-qPCR oraz RNA-seq) i białka (wykonane metodami Western blot, barwienia cytochemicznego) oraz szereg testów funkcjonalnych takich jak pomiar aktywności metabolicznej (test MTT), pomiar proliferacji komórek (test BrdU), modulacja metabolizmu beztlenowego i autofagii czy analiza wielkości i ziarnistości komórek oraz ich rozkładu w cyklu komórkowym z użyciem cytometrii przepływowej. Dodatkowo Autorka wykazała się sprawnym warsztatem analizy sygnalizacji komórkowej, jak również umiejętnością przeanalizowania danych wielkoskalowych otrzymanych metodą NGS.

Podsumowując tę część pracy, uważam, że metodyka była różnorodna i dobrana w sposób pozwalający na realizację wyznaczonych zadań. Opis metod został przygotowany starannie, pozwala zrozumieć i powtórzyć wykonane eksperymenty. Szerokie spektrum stosowanych metod badawczych potwierdza dobre przygotowanie Doktorantki do samodzielnej pracy naukowej.

Bardzo wysoko oceniam część pracy prezentującą **Wyniki**. Poczynione obserwacje są oryginalne i dostarczają nowych danych na temat rozwoju oporności na cisplatynę w liniach komórkowych raka płuca w warunkach hipoksji i możliwości jej przezwyciężenia przez hamowanie autofagii. Eksperymenty zostały dobrze zaplanowane, a ich dokumentacja przedstawiona rzetelnie. Uzyskane w modelu *in vitro* wyniki wskazują, że hipoksja powodowała wzrost oporności na cisplatynę (CIS) poprzez ucieczkę od starzenia komórkowego, czego nie zaobserwowano podczas zastosowania trucizn mikrotubul. Ucieczka przed starzeniem w komórkach leczonych CIS podczas niedotlenienia zależna była od szlaku sygnałowego p53/p21. Co ciekawe, niedotlenienie powodowało aktywację autofagii podczas leczenia CIS, a zahamowanie autofagii poprzez użycie farmakologicznego inhibitora, hydroksychlorochiny (HCQ) w tych warunkach zmniejszyło ucieczkę przed starzeniem się komórek raka płuca. Zastosowanie HCQ hamowało proliferację komórek oraz ekspresję białek związanych z progresją cyklu komórkowego, ale również wiązało się z indukcją fenotypu sekrecyjnego związanego ze starzeniem, zdolnością komórek do inwazji i migracji, a także rozwojem fenotypu macierzystego. Niestety, nie udało się ocenić efektów terapii HCQ *in vivo*, co byłoby szczególnie ciekawe w kontekście uzyskanych wyników *in vitro*, gdyż zastosowany myszy model nie zadziałał odpowiednio. Nie podano HCQ ze względu na brak skutecznego zahamowania wzrostu guzów po podaniu CIS i konieczność przedwczesnego zakończenia eksperymentów. W pracy analizowano również markery niedotlenienia i macierzystości w guzach od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Do tej części mam najwięcej pytań i wątpliwości. Badania przeprowadzono na grupie 5 chorych. Są to więc pojedyncze obserwacje, nieznamiennie statystycznie ze względu na niewielką liczbę pacjentów.

- Jakimi były kryteria doboru chorych do badania? Jaki tym histologiczny reprezentują analizowane próbki? Jaka była charakterystyka kliniczna badanej grupy?
- Jak pobierano 2 wycinki guza podczas resekcji chirurgicznej? Czy wiadomo jaka była zawartość komórek nowotworowych w pobranych wycinkach?
- Poproszę o komentarz odnośnie wybranej metody analizy ekspresji markerów. Cemu nie oceniano ekspresji na poziomie białek metodą barwienia IHC? Czy badanie IHC nie pozwoliłoby lepiej uchwycić heterogenności barwienia poszczególnych markerów *in situ* niż analizy na poziomie RNA izolowanego z mieszaniny komórek, dającego uśredniony dla danego guza wynik?

Na koniec w **Dyskusji** Autorka w sposób dojrzały i krytyczny dyskutuje wyniki własne na tle danych literaturowych. Tę część pracy czyta się bardzo dobrze. Pokazuje ona dobrą znajomość i płynne poruszanie się Doktorantki w tematyce związanej z prowadzonymi badaniami. Jednocześnie wybrzmiewa świadomość ograniczeń stosowanych modeli, jak również szeroki spojrzenie nie tylko na krótko- ale również długoterminowe konsekwencje modulacji autofagii, co świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Z obowiązku recenzenta, muszę zauważyć, że niestety w pracę wkradły się drobne błędy merytoryczne, np. kilkakrotnie pojawiająca się „odporność” zamiast „oporność” w kontekście leczenia.

Przetawione wyżej uchybienia nie obniżają wartości naukowej pracy. Cele pracy w większości zostały z powodzeniem zrealizowane, a niezrealizowane omówione szczegółowo. Należy podkreślić, że tematyka badań podjęta w pracy doktorskiej jest jak najbardziej istotna i aktualna, a uzyskane wyniki w sposób znaczący poszerzyły wiedzę na temat roli autofagii i starzenia w chemooporności raka płuca. Przedstawione i przedyskutowane przez Doktorantkę wyniki uważam za bardzo interesujące. Są już podstawą dobrej publikacji, której Doktorantka jest pierwszą autorką: *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.*

Podsumowując, stwierdzam, że uzyskane wyniki stanowią ważne naukowo osiągnięcie, a Autorka rozwiązała postawiony problem badawczy i potrafiła poprawnie przedstawić efekty swojej pracy w rozprawie doktorskiej. Wykazała się wiedzą, wnikliwością badawczą, umiejętnym wykorzystaniem szerokiego spektrum technik biologii komórki i biologii molekularnej oraz umiejętnością prezentacji, interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona 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). Dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Olszewskiej-Banach do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną rozprawy oraz częściowo już opublikowane wyniki pracy, zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie ocenianej pracy.

