



Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW  
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

Warszawa, 22.01.2024 r.

dr hab. Małgorzata Gajewska, prof. SGGW  
Zakład Biochemii i Dietetyki  
Katedra Nauk Fizjologicznych  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW

### RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Majewskiej pt. „Rola PTEN w hipoksyjnym mikrośrodku raka nerki i czerniaka” wykonanej w Laboratorium Onkologii Molekularnej i Terapii Innowacyjnych w Wojskowym Instytucie Medycznym – Państwowym Instytucie Badawczym pod kierunkiem Pani promotor prof. dr hab. Claudine Kieda oraz promotor pomocniczej dr Klaudii Brodaczewskiej.

Postępy w dziedzinie biologii nowotworów, pozwalają na coraz lepsze zrozumienie molekularnych mechanizmów nowotworzenia oraz wewnątrzkomórkowych procesów regulujących proliferację, wzrost i śmierć komórek nowotworowych. Coraz większą uwagę naukowcy przywiązują również do roli mikrośrodku w procesie tworzenia guzów. Lokalne mikrośrodko jest w stanie regulować metabolizm, tempo proliferacji komórek nowotworowych oraz angiogenezę na drodze bezpośrednich oddziaływań międzykomórkowych lub sygnałów parakrynnych. Nowe odkrycia pozwalają badaczom opracowywać nowoczesne strategie terapii przeciwnowotworowych, które obecnie nie ograniczają się jedynie do interwencji chirurgicznych, radioterapii, czy klasycznej chemioterapii z użyciem leków cytotoksycznych, lecz umożliwiają wykorzystanie związków wpływających również, lub przede wszystkim, na mikrośrodko guza. Najnowsze terapie przeciwnowotworowe obejmują m.in. terapię celowaną, działającą wybiórczo na receptory dla czynników wzrostu, białka kontrolujące procesy proliferacji lub śmierci komórek, czy też hamujące angiogenezę w pobliżu guza. Przeciwciała monoklonalne oraz inhibitory kinaz tyrozynowych należą do nowej generacji leków, stosowanych w terapii celowanej, o bardzo selektywnym działaniu, choć i one nie są pozbawione efektów niepożądanych. Potrzeba zwiększenia skuteczności terapii oraz rozwój oporności komórek nowotworowych na stosowane leki, zachęca do opracowywania metod leczenia opartych na terapii skojarzonej, polegającej na jednoczesnym podawaniu co najmniej dwóch związków o różnym mechanizmie działania lub łączeniu różnych typów terapii, np. chemioterapii z radioterapią.

Pomimo wprowadzanych coraz nowszych rozwiązań terapeutycznych, które bez wątpienia przyczyniły się do istotnego zwiększenia skuteczności leczenia chorób nowotworowych, naukowcom i lekarzom nie udało się dotychczas wygrać tej nierównej walki z przeciwnikiem jakim są nowotwory. W nowoczesne trendy badań z dziedziny onkologii wpisuje się również praca doktorska mgr inż.



**Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW**  
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

Aleksandry Majewskiej, dotycząca badań na modelach *in vitro* oraz *in vivo* raka nerki oraz czerniaka. Nowotwory skóry są jednymi z najczęściej diagnozowanych nowotworów na świecie. Tylko w 2020 roku zdiagnozowano aż 1,5 miliona nowych przypadków. Z kolei dane epidemiologiczne dotyczące raka nerki szacują, że ten nowotwór diagnozowany jest u ok. 430 tysięcy osób rocznie. Doktorantka w swojej pracy podjęła się badań weryfikujących skuteczność strategii terapeutycznej opartej na normalizacji naczyń w guzach nowotworowych za pośrednictwem trispirofosforanu mio-inozytolu (ITPP), wykazującego wielokierunkowy mechanizm działania poprzez kompensację niedotlenienia w guzach oraz aktywację białka PTEN w komórkach nowotworowych. Według opisu Doktorantki punktem wyjścia do badań było stwierdzenie braku skuteczności stosowania ITPP w mysim modelu nowotworu nerki (Renca), a odnotowanymi pozytywnymi skutkami tej terapii w przypadku modelu czerniaka (B16F10), w którym dochodziło do zmniejszenia guzów i redukcji obszaru nekrotycznego pod wpływem ITPP. Dlatego też praca doktorska została poświęcona zbadaniu molekularnych funkcji PTEN w obu typach nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem roli tego białka w normoksyjnym oraz hipoksyjnym mikrośrodkowisku guzów. Podjęty temat uważam, za zasadny, wpisujący się w światowe trendy badań z dziedziny biologii nowotworów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że już w hipotezie badawczej Doktorantka zwraca uwagę na istotne różnice w aktywności PTEN w stosowanych modelach raka nerki i czerniaka, co może przyczyniać się do różnic w odpowiedzi tych nowotworów na stosowane terapie. Aby zweryfikować postawioną hipotezę mgr inż. Aleksandra Majewska postawiła sobie trzy cele badawcze:

- 1) określenie wpływu niedotlenienia na poziom i aktywność PTEN oraz potencjał proangiogeny testowanych modeli (*in vitro*),
- 2) zbadanie roli PTEN w raku nerki i czerniaku, z wykorzystaniem edycji genomu metodą CRISPR/Cas9 do wytworzenia linii z mutacją PTEN – charakterystyka komórek z nokautem PTEN, określenie ich wrażliwości na leczenie *in vitro* oraz wpływ na progresję guzów *in vivo*,
- 3) sprawdzenie wpływu mutacji PTEN i niedotlenienia na modyfikację mikrośrodowiska guza poprzez regulację ekspresji miRNA w modelu raka nerki (*in vitro* i *in vivo*).

Wyniki otrzymanych badań zostały opublikowane w renomowanych międzynarodowych czasopismach z listy JCR w formie trzech oryginalnych artykułów naukowych, stanowiących podstawę przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Majewskiej. Publikacje tworzą jednotematyczny cykl artykułów opublikowanych w latach 2022 i 2023:

1. **Majewska, A.**, Brodaczewska K, Filipiak-Duliban A, Kieda C. Comparative analysis of the effect of hypoxia in two different tumor cell models shows the differential involvement of PTEN control of proangiogenic pathways. *Biochem Cell Biol.* **2023**; doi: 10.1139/bcb-2023-0047. (IF: 2.9; MEiN: 70)
2. Brodaczewska, K.\*, **Majewska A.\***, Filipiak-Duliban A, Kieda C. Pten knockout affects drug resistance differently in melanoma and kidney cancer. *Pharmacol Rep.* **2023**;75(5):1187-1199. doi: 10.1007/s43440-023-00523-y. (IF: 4.4; MEiN: 140)
3. **Majewska, A.**, Brodaczewska K, Filipiak-Duliban A, Kajdasz A, Kieda C. miRNA Pattern in Hypoxic Microenvironment of Kidney Cancer-Role of PTEN. *Biomolecules.* **2022**;12(5):686. doi: 10.3390/biom12050686. (IF: 5.5; MEiN: 100)



**Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW**  
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

Bardzo dobre parametry czasopism naukowych, w których ukazały się artykuły (sumaryczna wartość IF wynosi 12.8, a sumaryczna liczba punktów MEiN wynosi 310) wskazują na wysoką jakość i wartość badań prowadzonych przez Doktorantkę.

W dwóch z trzech artykułów mgr inż. Aleksandra Majewska jest pierwszym autorem, natomiast w artykule nr 2, opublikowanym w czasopiśmie *Pharmacological Reports*, jest na drugiej pozycji wśród wymienionych autorów, lecz w publikacji wyraźnie podana jest informacja o równym udziale pierwszej i drugiej autorki w powstaniu tej pracy. Chociaż w zamieszczonych na końcu pracy oświadczeniach współautorów rolę Doktorantki oszacowano na 51% w przypadku publikacji nr 1 i 3 oraz 38% w przypadku publikacji nr 2, o dominującej roli Doktorantki w przygotowaniu wszystkich publikacji świadczą opisy udziału w badaniach zamieszczone na końcu każdego z artykułów. Zdaniem recenzentki bardzo trudno jest oszacować w procentach udział wszystkich współautorów w powstaniu publikacji, nie krzywdząc poszczególnych osób zaangażowanych w projekt badawczy. Niejednokrotnie mamy do czynienia z równoczesną pracą wielu osób podczas jednego doświadczenia, czy analizy, a wyrażenie w procentach udziału danego członka zespołu w badaniach, wymusza na kierowniku projektu pomniejszenie roli niektórych osób, pomimo ich wyraźnego zaangażowania.

Wartość merytoryczna wyników przedstawionych w poszczególnych publikacjach tworzących ww. cykl została już wcześniej oceniona przez dwóch lub trzech niezależnych recenzentów podczas każdego procesu wydawniczego. Recenzja niniejszej rozprawy doktorskiej skupia się przede wszystkim na ocenie spójności cyklu przedstawionych artykułów naukowych. Dlatego oprócz ww. trzech publikacji dysertacja doktorska mgr inż. Aleksandry Majewskiej składa się również z autoreferatu, stanowiącego podsumowanie badań opisanych wcześniej w trzech artykułach. Rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Majewskiej nie posiada jednak tradycyjnego układu. Składa się co prawda ze spisu treści, wykazu skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, celu i założeń badawczych, jednak pominięto skrócony opis wyników i dyskusję. Zamiast tego, rozdział trzeci składa się z kopii opublikowanych prac, a następny rozdział jest krótkim (1,5 stronicowym) podsumowaniem otrzymanych wyników połączonym z wnioskami, które nie zostały wyraźnie wypunktowane. W dalszej kolejności dołączono stosowne oświadczenia współautorów publikacji, imponujący dorobek naukowy Doktorantki oraz spis literatury cytowanej we wstępie rozprawy, liczący aż 178 pozycji. Dysertacja napisana jest bardzo ładnym językiem, jednak zdaniem recenzentki brak zbiorczego omówienia wyników i sumarycznej dyskusji pozostawia pewien niedosyt. Podsumowanie zawarte w rozdziale czwartym jest krótsze od streszczeń zamieszczonych na początku rozprawy doktorskiej. Mimo, to recenzentka z wielkim zainteresowaniem przeczytała wszystkie publikacje stanowiące podstawę dysertacji i na tej podstawie oceniła spójność cyklu.

W rozdziale pierwszym, czyli we wstępie, Doktorantka opisuje aktualne informacje na temat roli mikrośrodowiska w patofizjologii nowotworów, szczególnie zwracając uwagę na stan niedotlenienia guzów nowotworowych i wpływ hipoksji oraz angiogenezy na progresję nowotworów. Następnie opisane zostały terapie celujące w angiogenezę guza, rola PTEN jako supresora nowotworów oraz znaczenie cząsteczek mikroRNA (miRNA) w regulacji nowotworzenia, ze szczególnym uwzględnieniem związku pomiędzy ekspresją miRNA w stanie hipoksji oraz ich roli w



**Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW**  
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

regulacji ekspresji PTEN. Wstęp w sposób jasny i logiczny prowadzi czytelnika do kolejnego rozdziału prezentującego cele i założenia pracy, które zostały poprawnie sformułowane. Wstęp wzbogacony jest również czterema starannie przygotowanymi rycinami, doskonale ilustrującymi zagadnienia omawiane w tekście pracy. Recenzentka ma jedynie uwagę do ryciny 4, w której przedstawiony został schemat skomplikowanych mechanizmów regulacji i lokalizacji PTEN w nowotworach, wpływających na różnorodność funkcji i znaczenie kliniczne tego białka. Zdaniem recenzentki w schemacie brakuje wskazania kierunku wpływu aktywności PTEN na wymienione procesy komórkowe: proliferację, apoptozę, metabolizm, stabilizację genomu, cykl komórkowy, angiogenezę, odpowiedź immunologiczną. Dodanie strzałek ( $\uparrow\downarrow$ ), lub symboli „+”, „-” doprecyzowałoby faktyczny efekt działania białka PTEN w komórkach nowotworowych.

W zwyczajowo przyjętym układzie rozprawy doktorskiej kolejny rozdział opisywałby metodykę pracy. W tym przypadku szczegółowy opis wykonywanych doświadczeń i użytych metod analitycznych znajduje się w treści załączonych artykułów naukowych. W tym miejscu recenzentka pragnie wyrazić swoje ogromne uznanie dla Doktorantki za ogrom pracy włożonej w przeprowadzone badania. Metodyka badań jest niezwykle bogata i różnorodna. Obejmuje zarówno modele *in vivo* (myszy szczepu BALB/c, u których indukowano guzy raka nerki lub czerniaka poprzez iniekcję komórek nowotworowych - odpowiednio linii Renca lub B16F10 - zawieszonych w Matrigelu rozcieńczonym buforem PBS); jak i modele *in vitro* hodowli komórek raka nerki (mysich oraz ludzkich), czerniaka (mysich), komórek śródbłónki naczyń (mysich) w warunkach normoksji oraz hipoksji. W sumie do badań użyto aż 8 linii komórkowych różniących się pochodzeniem oraz statusem ekspresji PTEN. Do realizacji wytyczonych celów badawczych Doktorantka użyła liczne techniki laboratoryjne, zarówno klasyczne, takie jak: PCR w czasie rzeczywistym, Western-blot, barwienie immunofluorescencyjne, testy ELISA, czy cytometrię przepływową; jak i nowoczesne, m.in. technikę edycji genów CRISPR/cas9, sekwencjonowanie nowej generacji wraz z analizami bioinformatycznymi umożliwiającymi predykcję genów regulowanych przez specyficzne miRNA, izolację egzosomów, czy analizę aktywności angiogenetycznej komórek śródbłónki w obecności pożywek pochodzących z komórek raka nerki hodowanych w warunkach normoksji i hipoksji.

Wyniki opisane w tekście trzech oryginalnych artykułów naukowych zaprezentowane zostały również w postaci licznych, rozbudowanych rycin zawierających wykresy zdjęcia, schematy. Przeprowadzona w każdym artykule dyskusja w sposób dojrzały i merytoryczny omawia otrzymane wyniki na tle dostępnej, zwykle najnowszej literatury i przedstawia wnioski płynące z danej części badań. Recenzentka żałuje jednak, że Doktorantka nie podjęła się przeprowadzenia w dysertacji zbiorczej dyskusji dla całego cyklu publikacji, będących podstawą jej rozprawy doktorskiej. W celu lepszego zobrazowania wniosków płynących z pracy można byłoby zaproponować schemat pokazujący rolę PTEN w czerniaku oraz w komórkach raka nerki, z uwzględnieniem różnic w aktywacji szlaków sygnałowych oraz w odpowiedzi na obniżonym poziomie tlenu w środowisku guza. Na podstawie wyników opisanych w artykułach Doktorantki nasuwa się wniosek, że ekspresja białka supresorowego PTEN odgrywa mniejszą rolę w progresji raka nerki, natomiast większe znaczenie ma stężenie tlenu w mikrośrodowisku guzów tworzonych przez te komórki nowotworowe. W warunkach hipoksji mysie komórki raka nerki – Renca, wykazywały obniżony poziom białka p53 (często określanego mianem strażnika genomu), obniżoną żywotność, podwyższony poziom



Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW  
ul. Nowoursynowska 159b, bud. 24, 02-776 Warszawa

wydzielanego czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF-A oraz innych bioaktywnych czynników stymulujących angiogenezę. Komórki Renca pozbawione ekspresji PTEN poprzez nokaut genu kodującego to białko nie różniły się istotnie ekspresją genu *Vegfa*, żywotnością, czy zdolnością do tworzenia guzów w porównaniu do komórek Renca wykazujących ekspresję PTEN. Również różnice w ekspresji miRNA odnotowane w toku badań wynikały przede wszystkim z obniżenia stężenia tlenu w środowisku, niż z nokautu genu *Pten*. Te różnice przyczyniły się do odmiennej odpowiedzi komórek raka nerki na podanie ITTP lub cisplatyny w porównaniu do komórek czerniaka. W przypadku mysiego modelu czerniaka – komórek linii B16F10 zastosowanie ITTP prowadziło do normalizacji naczyń, a nokaut genu *Pten* powodował uwrażliwienie komórek na cisplatynę, istotnie zmniejszając dawkę IC50 dla tego chemioterapeutyku. Komórki B16F10 pozbawione ekspresji PTEN wykazywały znacznie wyższy poziom ufosforylowanej formy kinazy Akt, co świadczy o aktywacji szlaku PI3K/Akt wspierającego przeżycie komórek. Jednocześnie obserwowano istotne obniżenie wydzielania inhibitora aktywatora plazminogenu: PAI-1, białka którego ekspresja wiąże się ze zwiększoną aktywnością komórek nowotworowych do migracji, inwazji czy angiogenezy. Opisane w artykułach Doktorantki wyniki wyraźnie potwierdzają różnice w roli PTEN w komórkach raka nerki i czerniaka. W podsumowaniu mgr inż. Aleksandra Majewska słusznie zwraca uwagę na kluczową rolę różnic w aktywności PTEN, jak i odpowiedzi na niedotlenienie w skuteczności stosowanych terapii przeciwnowotworowych. Dowodzi to konieczności poznania szczegółowej charakterystyki molekularnej różnych typów nowotworów, co pozwoli w przyszłości na lepsze dopasowanie terapii u pacjentów.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Majewskiej ma wysoką wartość merytoryczną i poznawczą. Szeroki zakres przeprowadzonych badań, z wykorzystaniem licznych technik laboratoryjnych, wymagał dużego nakładu pracy i umiejętności Doktorantki. O dużej wartości naukowej uzyskanych przez Doktorantkę wyników świadczy ich opublikowanie w czasopiśmie o dobrych wskaźnikach bibliometrycznych i światowym zasięgu.

#### **Wniosek końcowy**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Majewskiej pt. „Rola PTEN w hipoksyjnym mikrośrodowisku raka nerki i czerniaka” 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 Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Majewskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne. Jednocześnie z uwagi na wysoką ocenę merytoryczną cyklu publikacji stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.

/Dr hab. Małgorzata Gajewska, prof. SGGW/