



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKI HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 2019-05-22

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk
Zakład Onkologii Doświadczalnej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
Wrocław

Recenzja

*rozprawy doktorskiej Katarzyny Anny Kaławaj pt. „Aktywność
przeciwnowotworowa alfa-ketoglutaranu w modelu komórkowym ludzkiego
kostniakomięsaka”*

*wykonanej w Zakładzie Wirusologii i Immunologii Instytutu Mikrobiologii
i Biotechnologii UMCS*

*pod kierunkiem promotora dr hab. Barbary Zdzisińskiej, prof. UMCS
oraz promotora pomocniczego dr Adrianny Sławińskiej-Brych*

Recenzowana praca doktorska porusza bardzo aktualną i ważną tematykę związaną z metabolizmem energetycznym komórek nowotworowych i podejmowanymi próbami poszukiwania przeciwnowotworowych strategii terapeutycznych ukierunkowanych właśnie na ten proces. W tym przypadku, podjęto badania nad wpływem alfa-ketoglutaranu (AKG) na komórki kostniakomięsaka, zakładając iż w komórkach takich występuje obniżona ekspresja dehydrogenaz izocytrynianowych (IDH), lub występują one w formie zmutowanej.

Praca ma układ typowy dla prac eksperymentalnych, zawiera kompletny wykaz skrótów, tabel, rycin i wykresów oraz wszystkie niezbędne rozdziały. Wykaz piśmiennictwa jest odpowiednio dobrany, zawiera zarówno najnowsze pozycje, jak i prace starsze, jednak niezbędne dla prawidłowego zaprezentowania zarysu dotychczasowej wiedzy w poruszonym temacie.

We wstępie, Autorka w sposób syntetyczny, lecz jednocześnie wyczerpujący wprowadza do zagadnień będących przedmiotem jej rozprawy doktorskiej. Jest to bardzo dobre wprowadzenie, przedstawiające zarówno dane dotyczące samego kostniakomięsaka, jak i AKG wraz z jego rolą biologiczną, w tym dotąd poznaną w zakresie chorób nowotworowych. Jedyne drobne zastrzeżenia do tego rozdziału dotyczą niezręczności w użyciu niektórych sformułowań, jak np. na stronie 13 „leczenie tego nowotworu” – tutaj z pewnością byłoby użyć „leczenie przeciwnowotworowe”, lub „leczenie pacjentów z chorobą nowotworową” ponieważ zwykle nowotwór jest w „dobrej kondycji” i nie wymaga leczenia. Na stronie 15 Autorka użyła



określenia „dystalna” i „proksymalna” kość udowa czy piszczelowa – oczywiście chodzi o dystalną lub proksymalną część tych kości.

Bezpośrednio z opisanych we wstępie danych wynikają hipoteza badawcza i cele pracy uszczegółowione o zadania badawcze jasno przedstawione przez Doktorantkę, zakładające przeciwnowotworowe działanie AKG wynikające z potencjalnie występujących w komórkach nowotworowych mutacji w genie *IDH* lub obniżonego poziomu tego enzymu.

Kolejny rozdział pracy opisujący metodykę badań jest wystarczająco szczegółowy, aby prześledzić tok badań oraz zastosowane techniki badawcze. Autorka zastosowała szereg metod z zakresu biologii komórki czy biologii molekularnej, które umożliwiły scharakteryzowanie wpływu AKG na 2 linie komórkowe ludzkiego kostniakomięsaka. Podczas analizy tego rozdziału, w połączeniu z uzyskanymi wynikami chciałabym zadać pytanie odnośnie konstrukcji początkowych eksperymentów z zastosowaniem komórek prawidłowych i nowotworowych (cytotoksyczność, proliferacja czy aktywność metaboliczna komórek – zależnie od użytej metody). Dlaczego nie zastosowano analogicznego postępowania z komórkami nowotworowymi i prawidłowymi, przy użyciu chociażby jednego z tych testów? Przypomnę, iż komórki prawidłowe przebadano przy użyciu testu LDH po 24 godzinnej inkubacji (cytotoksyczność), zaś komórki nowotworowe oceniono po 72 godzinach inkubacji z AKG przy użyciu testu MTT i przy użyciu testu z wykorzystaniem BrdU. W mojej ocenie, trudno na tej podstawie jednoznacznie określić, że AKG ma inny wpływ na komórki nowotworowe niż prawidłowe. Pomimo, że stężenia AKG użyte wobec komórek nowotworowych nie były cytotoksyczne dla komórek prawidłowych w teście 24-godzinnym, nie można wykluczyć, że nie byłyby również cytotoksyczne dla komórek nowotworowych. I odwrotnie, bez odpowiedniego eksperymentu, nie można wykluczyć, że efekt obserwowany np. w teście MTT wobec komórek nowotworowych nie byłby analogiczny również wobec komórek prawidłowych.

Dalsze badania przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch linii komórek ludzkiego kostniakomięsaka wykazując wpływ AKG na cykl komórkowy, apoptozę, wybrane elementy szlaków sygnałowych i czynniki wzrostu (część badań przeprowadzono tylko na linii Saos-2). Wszystkie te badania opisano i przeprowadzono z dużą starannością. Bardzo dobrze analizuje się tak przejrzysto zaprezentowane wyniki badań. Same wyniki również są bardzo interesujące i wskazują na potencjalne mechanizmy mogące odpowiadać za antyproliferacyjne działanie AKG wobec zastosowanych komórek. W toku tych badań, Doktorantka wykazała, że AKG hamuje cykl komórkowy w fazie G1 poprzez modulowanie ekspresji cykliny D1 i białka p21; indukuje apoptozę komórek nowotworowych, zwłaszcza Saos-2 aktywując kaspazy (3, 8 i 9), zwiększając ekspresję białka Bax i obniżając Bcl-2; wpływa na szlaki sygnałowe MAPK, poprzez obniżenie poziomu fosforylacji ERK1/2 i aktywację kinazy JNK, bez wpływu na kinazę p-38. Dokładniejszą analizę przeprowadzono w stosunku do oceny wpływu AKG na aktywację kinazy JNK, udowadniając, że zastosowanie specyficznego inhibitora tej kinazy



niweluje proapoptotyczne efekty AKG. Ponadto Autorka zaobserwowała wpływ AKG na fosforylację kinazy Akt, a także zdolność do wydzielania VEGF i TGF β przez komórki oraz jego wpływ na potencjał migracyjny i inwazyjny komórek kostniakomięsaka.

W trakcie analizy tych wyników zaintrygował mnie szczególnie aspekt związany ze zróżnicowaną odpowiedzią komórek tych dwóch linii kostniakomięsaka na AKG np. w odniesieniu do zdolności do indukowania apoptozy. Nawiązując do hipotezy badawczej, zakładającej, że przeciwnowotworowy wpływ AKG w tych komórkach wynikać może z mutacji lub zmniejszonej ekspresji IDH, trudno nie zadać pytania o charakterystykę wykorzystanych linii komórkowych pod kątem właśnie chociażby ekspresji IDH we wszystkich liniach użytych w badaniach. Globalne profile mRNA dla linii nowotworowych użytych w badaniach są poznane i dostępne w repozytoriach danych, a w pracy *Br J Cancer*. 2013 Oct 15; 109(8): 2228–2236 zaprezentowano ich powiązanie z agresywnym fenotypem tego typu nowotworów (w tym obu linii nowotworowych używanych przez Doktorantkę). Wobec tego, jeśli w badaniach własnych nie oceniono profilu ekspresji IDH, to warto byłoby sięgnąć do baz danych i na tej podstawie porównać obie linie komórkowe. Proszę więc w trakcie dyskusji o odniesienie się do różnic we wrażliwości na AKG pomiędzy tymi liniami w zależności od profilu ekspresji IDH czy ogólnie zróżnicowanego potencjału inwazyjnego tych komórek (w ramach dostępnych danych).

W dyskusji Autorka po kolei omawia przeprowadzone przez siebie badania porównując uzyskane dane z dotychczas opisanymi w piśmiennictwie naukowym i wskazując, jakie znaczenie mogą mieć uzyskane wyniki w kontekście potencjalnych efektów biologicznych AKG np. w odniesieniu do procesu inwazyjnego wzrostu guza, angiogenezy czy przerzutowania, także oporności na chemioterapię itp. Uzyskane dane generalnie wskazują na potencjalną aktywność przeciwnowotworową AKG wobec kostniakomięsaka, a jednocześnie stają się podstawą do zadawania całego szeregu pytań w kontekście dotyczącym molekularnego mechanizmu przeciwnowotworowego działania AKG. Dzięki takiemu szerokiemu podejściu do podjętych badań, Autorka uzyskała bardzo wartościowe wyniki wyraźnie wskazujące, w jakich kierunkach należałoby pogłębiać te analizy. W związku z tym, Doktorantka wyciąga 6 dobrze sformułowanych wniosków, a każdy z tych wniosków jest jednocześnie potencjalnym nowym kierunkiem badań nad aktywnością AKG w komórkach kostniakomięsaka.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Katarzyny Anny Kaławaj to obszerna analiza potencjalnych molekularnych mechanizmów działania AKG wobec komórek kostniakomięsaka, przedstawiona w sposób przejrzysty, ukazująca szeroki zasób technik badawczych, którymi Doktorantka sprawnie się posługuje, a także pokazująca jej znaczne umiejętności odnośnie analizy uzyskanych danych i wyciągania racjonalnych wniosków z przeprowadzonych badań. Moje drobne uwagi przedstawione w tekście recenzji



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

nie mają wpływu na całościowy bardzo pozytywny odbiór pracy, a mają na celu wskazać np. ewentualne zagadnienia do przemyślenia i dyskusji.

Wobec powyższego, uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Anny Kaławaj pt. „*Aktywność przeciwnowotworowa alfa-ketoglutaranu w modelu komórkowym ludzkiego kostniakomięsaka*” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w *Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora*, tym samym wnioskuję do Rady Naukowej Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Anny Kaławaj do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk