

Dr hab. n. o zdr. Grzegorz Raszewski
Zakład Toksykologii i Bezpieczeństwa Żywności
Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki
Ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kaławaj p. t. „ Aktywność przeciwnowotworowa alfa-ketoglutaranu w modelu komórkowym ludzkiego kostniakomięsa”, wykonanej w Zakładzie Wirusologii i Immunologii Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem dr hab. Barbary Zdzisińskiej, prof. nadzw. UMCS

Przedłożona rozprawa doktorska mgr Katarzyny Kaławaj dotyczy ważnego zagadnienia jakim jest badanie aktywności przeciwnowotworowej związków, które potencjalnie mogą działać wybiórczo na komórki nowotworowe. O ważności i aktualności tego zagadnienia świadczy z jednej strony brak w pełni skutecznej chemioterapii przeciwnowotworowej, związany głównie z opornością wielolekową pacjentów oraz z tego, że obecnie stosowane chemioterapeutyki posiadają niską selektywność i specyficzność w stosunku do komórek nowotworowych. Dodatkowo, konwencjonalna terapia często wykazuje znaczną toksyczność ogólnoustrojową, która wynika z jej cytotoksycznego działania na tkanki prawidłowe.

Z drugiej strony, za aktualnością tej tematyki przemawia, znaczny wzrost liczby krajowych i światowych ośrodków naukowych zajmujących się zarówno, przesiewowymi badaniami licznych substancji i preparatów w kierunku pożądanych właściwości przeciwnowotworowych jak również modyfikujących znane związki lub syntetyzując nowe substancje w tym kierunku.

Problem opracowania nowej, bardziej efektywnej terapii przeciwnowotworowej jest bardzo istotny gdyż jak wskazuje Światowa Organizacja Zdrowia WHO, głównie z powodu starzenia się społeczeństw i wzrostu populacji, prognozy liczby zachorowań na raka w 2025r sięgają już 19.3 mln przypadków rocznie. W Polsce, z danych statystycznych wynika, że ok. 1/4 wszystkich zgonów jest następstwem choroby nowotworowej. Są one drugą najczęstszą, po chorobach układu krążenia, przyczyną śmierci Polaków.

U młodych ludzi pierwotnym nowotworem kości, najczęściej rozpoznawanym jest kostniakomięsak (osteosarcoma), którego szczyt zachorowań przypada pomiędzy 15 a 19 rokiem życia. Niestety, aż u ponad połowy pacjentów w momencie rozpoznania stwierdza się zmiany przerzutowe, które najczęściej lokują się w płucach oraz w ośrodkowym układzie nerwowym, co w połączeniu z dużą opornością na chemioterapię tego nowotworu, daje niekorzystne rokowania na skuteczną terapię. Jak podaje Autorka pracy, leczenie kostniakomięsaka przynosi efekty tylko w ok. 60% przypadków, w pozostałych, rokowania z uwagi na wzrastającą lekooporność pacjentów i liczne przeżuty są niekorzystne.

W związku z powyższym, podjęte przez Panią mgr Katarzynę Kaławaj badania właściwości przeciwnowotworowych alfa-ketoglutaranu (AKG), wpisuje się w ten

ogólnoświatowy trend i co jest istotne, badania te dotyczą bardzo ważnego w terapii nowotworów problemu jakim jest selektywne przeciwnowotworowe działania potencjalnego leku na określony typ nowotworu.

Warte podkreślenia jest, że badania zrealizowane w ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane z grantu badawczego Narodowego Centrum Nauki Opus 6 (Grant 3013/11/B/NZ4/04557).

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska liczy 129 ponumerowanych stron maszynopisu i ma ogólnie przyjęty dla tego typu opracowań układ. Pracę rozpoczyna rozdział *Wykaz skrótów* (6 stron) – starannie przygotowany i bardzo pomocny w naszpikowanym trudną nomenklaturą naukową tekście. Dalej opracowanie podzielone jest na rozdziały: *Wstęp* (20 stron); *Cel pracy* (1 strona); *Materiały* (7 stron); *Metody* (13 stron); *Wyniki* (33 strony); *Omówienie wyników i dyskusja* (13 stron) *Wnioski* (1 strona) *Streszczenie* (3 strony) angielskojęzyczny *Abstract* (2 strony) i *Piśmiennictwo* (12 stron). Pracę zamyka *Spis rycin i tabel* (2 strony) oraz *Spis wykresów* (2 strony).

Wstęp jest bardzo rozbudowany i stanowi bogate źródło wiedzy o kostniakomięsaku i badanym związku alfa-ketoglutaranie (AKG). W części dotyczącej kostniakomięsaka, autorka posiłkując się dobrze dobranym piśmiennictwem, uwzględniającym publikacje najnowsze, przedstawia bogatą syntezę poglądów na temat klasyfikacji, występowania, epidemiologii, etiologii oraz objawów, diagnostyki i leczenia kostniakomięsaka. Na szczególną uwagę, moim zdaniem zasługuje podrozdział „Najczęstsze zaburzenia molekularne występujące w kostniakomięsaku”. Doktorantka w syntetyczny ale wystarczający dla zrozumienia zagadnienia sposób, przedstawiła zaburzenia w głównych szlakach przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego, które mogą sprzyjać proliferacji komórek nowotworowych kostniakomięsaka i ich przerzutowaniu.

W części wstępu dotyczącej badanego związku, obok szczegółowego opisu powstawania i roli endogenego AKG mamy również dane dotyczące właściwości stosowanego w pracy egzogenego AKG. Warto podkreślić jest starannie przygotowany, obszerny (5 stron) przegląd dotychczasowych badań właściwości przeciwnowotworowych AKG uwzględniający również badania lubelskich naukowców.

Rozdział ten jest napisany jasno i zrozumiale i doskonale uzupełnia wiedzę osób, którzy nie zajmują się ściśle tą tematyką, jednocześnie wskazuje na obszerną i dobrze uporządkowaną wiedzę Doktorantki w wybranym obszarze jej działalności naukowej.

Jedyna drobna uwaga, która nasuwa mi się po przeczytaniu *Wstępu* dotyczy, moim zdaniem braku kilku zdań, przedstawiających, również liczbowo, sytuację epidemiologiczną w Polsce, jeżeli chodzi o zapadalność i umieralność na choroby nowotworowe, zwłaszcza, że autorka podaje, że zapadalność na kostniakomięsaka w Polsce stanowi 1% wszystkich nowotworów.

Cele pracy są jasno sformułowane i wynikają z postawionej wcześniej hipotezy badawczej, której założenia zostały również skrótowo przedstawione. Tak przedstawione cele pracy z podaniem co było podłożem ich sformułowania jest bardzo trafne i jak uważam stanowi wzór do naśladowania. W dalszej części Doktorantka przedstawiła w punktach analizowane w pracy aspekty badawcze. Uważam, że w tym punkcie bardziej trafne byłoby sformułowanie jakie cele szczegółowe były badane, ale to są drobnostki.

Materiały i metody. Badania zostały zaplanowane z wykorzystaniem różnorodnych metod i technik badawczych stosowanych rutynowo w badaniach *in vitro*, które zostały precyzyjnie i wyczerpująco przedstawione. Również materiały wykorzystane podczas pracy (odczynniki, materiały do hodowli tkankowych, linie komórkowe, bufory, przeciwciała i komercyjne zestawy do oznaczeń oraz użyty sprzęt laboratoryjny), zostały bardzo dokładnie wymienione z podaniem producenta. Dobrane przez mgr Katarzynę Kaławaj procedury badawcze są efektywne, uznane i zwalidowane co gwarantuje wiarygodność otrzymanych wyników i co za tym idzie poprawność odpowiedzi na stawiane pytania oraz realizację postawionych celów badawczych.

Otrzymane wyniki doświadczalne zostały poddane analizie statystycznej, która nie budzi zastrzeżeń, gdyż przyjęte testy statystyczne są odpowiednie i nie odbiegają od przyjętych w nauce standardów.

Doktorantka, co jest godne pochwały i ważne z punktu widzenia rzetelności otrzymanych wyników, prowadziła swoje badania na podwojonych modelach doświadczalnych tj. na dwóch prawidłowych liniach komórkowych: komercyjnych komórkach osteoblastów człowieka i wyprowadzonych w swoim zakładzie prawidłowych fibroblastach skóry ludzkiej, oraz dwóch liniach komórkowych ludzkiego kostniakomięsa. Brakuje mi jednak uzasadnienia tak wybranych modeli doświadczalnych oraz wskazanie charakterystycznych cech i różnic, szczególnie między używanymi liniami komórkowymi kostniakomięsa.

Do tej części rozprawy mam również uwagę. Ocenę toksyczności AKG (test LDH) względem prawidłowych linii HSF i hFOB 1.19 zaplanowano tylko przy 24-godz. ekspozycji, moim zdaniem, należałoby rozszerzyć to badanie również o inne czasy ekspozycji, stosowane przy ocenie pływu AKG na zachodzące procesy w komórkach linii kostniakomięsaków Saos-2 i HOS. Są to jednak drobne uwagi i nie wpływają na całościową wysoką ocenę części metodycznej.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów, opisano w sposób jasny i zobrazowano w czytelny sposób w postaci licznych wykresów i rycin, znacznie ułatwiający ich interpretację i zrozumienie wynikających zależności. Nie jestem zwolennikiem formy zastosowanych w pracy tytułów podrozdziałów np. „AKG hamuje cykl komórkowy w komórkach Saos-2 i HOS w fazie G1” wolę „Wpływ AKG na cykl komórkowy w komórkach Saos-2 i HOS” ale to są moje indywidualne preferencje.

Z obowiązku recenzenta jednak muszę zwrócić uwagę na pewne wątpliwości oraz uchybienia zauważone podczas czytania tego rozdziału:

(1) Cytotoksyczność AKG względem komórek prawidłowych była badana testem LDH, natomiast test żywotności/prolifracji komórek kostniakomięsa testem MTT i potwierdzony testem BrdU, zakłóca to jednoznaczną interpretację. Uważam, że korzystne dla oceny cytotoksyczności AKG, byłby pomiar LDH także w stosunku do linii komórek kostniakomięsa.

(2) Wyniki testu MTT po 96 godzinnej inkubacji z AKG wykazały hamowanie proliferacji obu linii komórek kostniakomięsa proporcjonalnie do zastosowanego stężenia badanej substancji. Jednak test BrdU potwierdzający aktywność przeciwaproliferyjną AKG został wykonany przy innym czasie inkubacji z AKG, wynoszącym 48 godz. Również przy tym czasie ekspozycji AKG wykazano jego hamujący wpływ na cykl komórkowy komórek kostniakomięsa i na ekspresję białek związanych z cyklem komórkowym tj. cykliny D1 i

inhibitora kinaz zależnych od cyklin białka p21Waf1/Cip (tu po 6 i 24 godz. inkubacji). Rozumiem, że różne czasy ekspozycji AKG wynikały z chęci pokazania jego najbardziej wyraźnego wpływu na daną aktywność komórek kostniakomięsa związaną z procesem nowotworowym, jednak ogranicza to ich jednoznaczną interpretację.

(3) Doktorantka wykazała, że AKG, stosowany przez 72 godz. proporcjonalnie do zastosowanego stężenia indukował apoptozę w komórkach linii kostniakomięsa Saos-2 i HOS. Zostało to udowodnione bezpośrednio poprzez specyficzne barwienie i analizę cytometryczną komórek, oraz pośrednio poprzez wykazanie aktywacji efektorowej kaspazy-3. Jednocześnie stwierdzono, że mechanizm indukowania apoptozy przez AKG w komórkach nowotworowych był związany głównie przez jej szlak wewnętrzny (aktywacja głównie kaspazy-9 oraz wzrost poziomu białka Bax i opóźnienie Bcl-2) z obniżeniem aktywacji szlaku ERK $\frac{1}{2}$ i Akt oraz aktywacją szlaku sygnałowego JNK. Ponadto, AKG obniżał wytwarzanie czynników wzrostu TGF- β i VEGF przez komórki kostniakomięsa oraz hamował ich migrację i inwazyjność. W tej części pracy, trochę brakuje mi informacji, czy przy 24 lub 48 godz. ekspozycji AKG również indukował apoptozę, zwłaszcza, że w 72 godz. już najniższe stężenie AKG - 5 mM wywoływało ten proces w obu liniach komórkowych. Czy przy krótszym czasie ekspozycji, AKG (w stosowanych dawkach 10-50mM) indukował apoptozę w stopniu utrudniającym badanie jej mechanizmów ?

Te nieścisłości tylko w niewielkim stopniu rzutują jednak na ocenę tego rozdziału, który oceniam wysoko. Uważam, że całość rozdziału stanowi dowód rzetelnej i pracowitej oraz dobrze zaplanowanej i wykonanej pracy badawczej, która pozwoliła w pełni zweryfikować założone cele. Obserwacje poczynione przez Doktorantkę mają istotne implikacje praktyczne i mam nadzieję, również przedkliniczne i kliniczne, jednak wymagają dalszych szczegółowych badań.

W rozdziale *Omówienie wyników i dyskusja* Autorka porównała i przedyskutowała otrzymane wyniki z innymi badaniami, posiłkując się biegłą wiedzą zaczerpniętą z angielskojęzycznego (chyba wyłącznie) najnowszego fachowego piśmiennictwa naukowego. Co jest warte podkreślenia, rozdział ten jest napisany syntetycznie, ale jednocześnie wyczerpująco i nie ma tam informacji zbędnych, zwiększających tylko objętość tekstu. Całość jest zajmująca i czytałem ją z dużym zainteresowaniem. W sposób, wskazujący na naukową dojrzałość, czyli klarowny i wnikliwy a jednocześnie rozważny i krytyczny, Doktorantka przeanalizowała wszystkie uzyskane wyniki i zaprezentowała swoje sugestie i opinie skonfrontowane z badaniami i wnioskami innych autorów. Mgr Katarzyna Kaławaj oceniając zebrany własny materiał dowodowy, zdaje sobie sprawę, z praktycznych implikacji własnej pracy. W sposób powściągliwy wskazuje, że AKG może być obiecującym środkiem terapeutycznym w hamowaniu angiogenezy oraz przerzutowania kostniakomięsa, jednak widzi potrzebę dalszych badań z wykorzystaniem zwierzęcych modeli badawczych.

Wnioski końcowe sformułowane w postaci sześciu krótkich zdań są spójne, rzeczowe i niosą skoncentrowaną informację wprost wynikającą z przeprowadzonych badań. Wniosek pierwszy w lakoniczny sposób, zgodnie z zasadami rozpraw doktorskich, wprost wskazuje, że Doktorantka osiągnęła założony cel główny badania. Wnioski pozostałe, a właściwie syntetyczne wyniki przeprowadzonych badań, pokazują, że pozostałe szczegółowe założenia badawcze również zostały zrealizowane. Moim zdaniem, można było również sformułować wniosek wskazujący, że wykryte właściwości egzogenego AKG, mogą mieć potencjalne

znaczenie w terapii kostniakomięsa, ale potrzebne są dalsze pogłębione badania przedkliniczne i kliniczne.

Dwa następne rozdziały, *Streszczenie* i angielskojęzyczny *Abstract* w skrótovej formie w pełni odzwierciedlają omawianą pracę doktorską.

Piśmiennictwo liczy 246 pozycji, jest starannie dobrane, w całości angielskojęzyczne i odpowiednio wykorzystane. Cytowane pozycje są głównie publikacjami opublikowanymi po 2000 roku, z czego wiele po 2010 r. w tym 17 pozycji to publikacje najnowsze z lat 2017-2018. Liczba i rok publikacji świadczy, że Autorka potrafi selekcjonować dane doświadczalne i co jest równie ważne dane polemiczne, w zależności od ich wagi dowodowej i znaczenia, co stanowi również ważny walor przyszłego naukowca.

Rozprawa doktorska napisana jest poprawnym językiem, w odpowiedniej stylistyce charakterystycznej dla tego typu prac, z użyciem poprawnej terminologii naukowej. Niestety jako recenzent zmuszony jestem wskazać nieliczne uchybienia, które nie wpływają jednak na wysoką merytoryczną ocenę i nie umniejszają istotnych osiągnięć pracy:

(1) Cały podrozdział *Wstępu – wprowadzenie*, gdzie zawarte są liczne szczegółowe informacje nie zawiera informacji skąd zostały one zaczerpnięte. W następnych podrozdziałach są one w większości dokładnie opisane z podaniem źródeł, jednak moim zdaniem w pracy naukowej, każda szczegółowa informacja obca, powinna posiadać swój odnośnik.

(2) Autorka, szczególnie we wstępie, podaje dużo różnorodnej, wielozdaniowej informacji dotyczących danego zagadnienia i potem cytuje jednocześnie 4-5 publikacje źródłowe, sugerując cytowanie 1-2 najważniejszych pozycji z rozbiem na poszczególne szczegółowe informacje.

(3) Niefortunne sformułowania: np. – „zły” czynnik rokowniczy (str. 23) proponuje zamienić na „niekorzystny”; dane literaturowe (str. 33) – pojęcie literatura, kojarzy nam się bardziej z literaturą piękną, tu bardziej odpowiednie byłoby zastosowanie terminologii „piśmiennictwo”; sformułowanie „w komórkach ssaczy” (str. 33) zgrabniej byłoby np. „w komórkach u ssaków lub w komórkach ssaków”; termin „anty-inwazyjny wpływ” (str. 93) – unikajmy angielskojęzycznych kalek językowych i tam gdzie można stosujmy polską terminologię np. „przeciw inwazyjny” wpływ... .

(4) W wynikach (str. 66 i dalej np. w dyskusji), białko będące inhibitorem zależnych od cyklin p21 Waf1/Cip1, raz występuje pod pełną nazwą w innych miejscach jako białko p21. W wykazie skrótów jest pokazane, że nazwy te mogą występować zamiennie jednak sugerowałbym po pierwszym użyciu pełnej nazwy „p21 Waf1/Cip1” ze skrótem (p21), później już konsekwentnie trzymać się skrótovej nazwy „p21”.

(5) Dobrze byłoby ujednoczyć i stosować skrót „godz.” inkubacji, gdyż występują naprzemiennie pełne sformułowania i wskazany skrót (np. str.71).

W całym tekście, miejscami przewijają się również niedociągnięcia interpunkcyjne, zwłaszcza brak przecinków, jednak to są już mało istotne szczegóły.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona rozprawa doktorska pod względem merytorycznym, metodologicznym i warsztatowym jest więcej niż poprawna i zasługuje na wysoką ocenę. Jest to obszerne opracowanie z użyciem nowoczesnych wysokospecjalistycznych metod i technik badawczych, bardzo pracochłonne i wymagające od

wykonawcy dużej wiedzy i sprawności laboratoryjnej. Doktorantka, poprzez prawidłowe sformułowanie problemu i dobrze dobrane techniki badawcze, które umożliwiają uzyskanie wiarygodnych wyników na wysokim poziomie i służą jego rozwiązaniu, a także poprzez prawidłową i odpowiednią konfrontację swoich wyników badań z wynikami i wnioskami innych badaczy, udowodniła, że sprawnie porusza się w badanych zagadnieniach i jest przygotowana do prowadzenia badań naukowych.

Jej praca doktorska, solidna i starannie zredagowana, przedstawia bardzo cenne, pogłębione dobrze udokumentowane obserwacje, rzucające światło na zagadnienia dotychczas bardzo słabo, lub w ogóle nie prezentowane w światowym piśmiennictwie. Praca ta ma również niekwestionowany i bardzo cenny walor praktyczny, gdyż może być jednocześnie obiecującym wstępem do dalszych badań, już na modelach zwierzęcych, potencjalnie w kierunku wykorzystania AKG w terapii leczenia kostniakomięsaka.

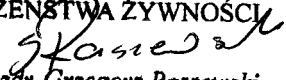
Wniosek końcowy:

Stwierdzam, że oceniana Rozprawa doktorska pt. „Aktywność przeciwnowotworowa alfa-ketoglutaranu w modelu komórkowym ludzkiego kostniakomięsaka” w pełni spełnia kryteria przypisane pracom na stopień naukowy doktora.

Dlatego z pełnym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Kaławaj do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na walory merytoryczne pracy, jej wartość badawczą i aplikacyjną wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału o wyróżnienie rozprawy i jej nagrodzenie.

Lublin, 06.06.2019r

KIEROWNIK
ZAKŁAD TOKSYKOLOGII
I BEZPIECZEŃSTWA ŻYWNOŚCI

dr hab. n. o. zdr. Grzegorz Raszeński