

Prof. dr hab. med. Radosław Rola  
Katedra i Klinika Neurochirurgii  
i Neurochirurgii Dziecięcej  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Adriana Zajęca  
pt. „Temozolomid oraz inhibitory szlaków zależnych od receptora TrkB w indukcji  
programowanej śmierci ludzkich komórek glejaka *in vitro*“  
przygotowanej pod kierunkiem dr hab. Joanny Jakubowicz-Gil  
z Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Złośliwe nowotwory glejowe ośrodkowego układu nerwowego stanowią jedno z największych wyzwań dla współczesnej neuroonkologii. Pomimo wyraźnego postępu w technikach operacyjnych umożliwiających uzyskanie rozległych resekcji z niewielkim ryzykiem niekorzystnych następstw neurologicznych oraz wdrożenia zaawansowanych protokołów leczenia wspomagającego z zastosowaniem radiochemioterapii i strategii immunomodulacyjnych jak dotychczas nie osiągnięto istotnej poprawy całkowitej przeżywalności pacjentów cierpiących na te schorzenia. Z tej perspektywy szczególnie istotnym jest fakt, że nowotwory te charakteryzują się wysoką heterogennością znajdującą odzwierciedlenie w dużym potencjale proliferacyjnym i migracyjnym komórek nowotworowych co prawdopodobnie leży u podstaw ich dużej oporności na konwencjonalne strategie terapeutyczne. W tym kontekście istotnego znaczenia nabierają projekty badawcze zorientowane na modyfikację złożonych mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za powyższą charakterystykę komórek złośliwych guzów glejopochodnych. W powyższy nurt znakomicie wpisuje się praca doktorska mgr Adriana Zajęca, która podejmuje bardzo istotny problem zastosowania inhibitorów wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału przeżycia regulowanych przez receptor TrkB jako potencjalnych celów terapeutycznych w terapiach personalizowanych opartych o cele molekularne stanowiących strategię wspomagającą dla standardowych protokołów terapeutycznych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera 120 stron tekstu, 8 tabel i 32 ryciny podzielone na rozdziały typowe dla dysertacji doktorskiej. Piśmiennictwo zawiera 108 pozycji literatury dobranej zgodnie z problematyką pracy. Ma ono w większości ma charakter obcojęzyczny co w istotny sposób podkreśla lukę w badaniach, którą w literaturze polskiej w znacznej części wypełnia praca Doktoranta. Dysertacja jest napisana ładną polszczyzną, pewną wątpliwość budzą jedynie pojawiające się niekiedy makaronizmy - vide str. 12, gdzie pojawia się termin oligodendrogliomy podczas gdy w polskiej terminologii tego typu guzy noszą nazwę odpowiednio skąpodrzewiaka i skąpodrzewiaka anaplastycznego. Pewne zastrzeżenia budzi też strona edytorska pracy np. Rycina 3 na stronie 10 – cytuje jako źródło pochodzenia artykuł Allen et al (*Nature, 2009, 457: 675*) nie przytaczając jednocześnie informacji o uzyskaniu zgody na zastosowanie ryciny objętej ochroną praw autorskich. W takim przypadku należałoby raczej skorzystać z ilustracji własnych lub zasobów sieciowych objętych otwartą licencją (Creative Commons - CC, General Public Licence – GPL lub podobną). Błędy edytorskie można znaleźć również w tekście (np. brak cytowania przy metodyce techniki mikroskopii elektronowej – str. 47). Pewne wątpliwości budzi również uporządkowanie piśmiennictwa – praca cytowana na stronie 14 (pozycja piśmiennictwa nr. 15) jest w zasadzie niemożliwa do zidentyfikowania (Criteria P., Implications P. (1975). Glioblastoma Multiforme and Anaplastic Astrocytoma ???). Podobny problem dotyczy pozycji 27 piśmiennictwa cytowanej na stronie 19 (Katedrze P. W., Akademii O. (2008). Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego. 1–105 ???)

We wstępie uporządkowanym w logicznie uszeregowane podrozdziały Doktorant w skrócie przedstawia podstawy anatomiczne i histologiczne budowy ośrodkowego układu nerwowego. Kolejno Autor charakteryzuje złośliwe guzy OUN z naciskiem na nowotwory glejopochodne III i IV stopnia złośliwości wg. WHO po czym w wyczerpujący sposób przedstawia czynniki etiologiczne związane z ich rozwojem oraz molekularne mechanizmy odpowiedzialne za transformację nowotworową komórek glejowych wraz ze zwięzłym opisem strategii terapeutycznych stosowanych w leczeniu w/w nowotworów OUN. Następnie szczegółowo przedstawia charakterystyki stosowanych przez niego inhibitorów wewnątrzkomórkowych szlaków przeżycia komórek zależnych od receptora TrkB oraz w zwięzły, ale w przejrzysty sposób opisuje mechanizmy śmierci komórkowej na które wywierają wpływ analizowane szlaki transdukcji sygnału. Zastrzeżenia budzi

tutaj jedynie niewielka ilość informacji klinicznych, które w przypadku prezentacji zagadnień z zakresu neuroonkologii w istotny sposób ułatwiają czytelnikowi zapoznanie się ze złożonością problemu terapeutycznego jakim są złośliwe guzy glejopochodne.

W części badawczej, w rozdziale poświęconym celom pracy Doktorant w sposób klarowny prezentuje problem badawczy jakim jest ocena właściwości przeciwnowotworowych wybranych inhibitorów tj. LY294002, sorafenibu, U-73122 oraz LOXO-101 w kombinacji z chemoterapeutyką (temozolomidem) stosowaną w leczeniu złośliwych guzów glejopochodnych w kontekście eliminacji komórek ludzkich linii komórkowych gwiazdziaka anaplastycznego i glejaka wielopostaciowego na drodze indukcji zaprogramowanej śmierci wraz ze zdefiniowaniem 4 hipotez cząstkowych które są przez Doktoranta analizowane na poszczególnych etapach prowadzonych badań.

W kolejnym rozdziale poświęconym Materiałom i Metodam Autor przedstawia organizację badań oraz szczegółowo opisuje zastosowane techniki badawcze. Godne pochwały jest szczegółowe podanie stosowanych odczynników, buforów czy też linii komórkowych co w istotny sposób poprawia wiarygodność badań oraz umożliwia ewentualną bezproblemową reprodukcję uzyskanych wyników.

W rozdziale poświęconym Wynikom, Autor szczegółowo opisuje wpływ stosowanych substancji i technik molekularnych stosowanych zarówno pojedynczo jak i w różnych kombinacjach na indukcję różnych mechanizmów śmierci komórkowej w analizowanych liniach komórkowych bogato ilustrując uzyskane wyniki przy pomocy tabel i rycin. Następnie Doktorant bardzo szczegółowo analizuje ekspresję oraz aktywność białek markerowych odpowiedzialnych za różne mechanizmy kontrolowanej śmierci komórkowej. W kolejnym podrozdziale Doktorant przedstawia charakterystykę zmian w organizacji wewnątrzkomórkowej komórek badanych linii pod wpływem stosowanych inhibitorów i chemioterapeutyków po czym analizuje zmiany zachodzące w ekspresji i aktywności wewnątrzkomórkowych szlaków przeżycia komórek zależnych od receptora TrkB włączając w to ocenę działania wybranych przez Siebie substancji na w/w szlaki w kontekście ich wyciszenia z zastosowaniem specyficznych dla nich siRNA. Ostatni z podrozdziałów poświęcony jest przedstawieniu wpływu badanych inhibitorów na potencjał migracyjny komórek gwiazdziaka anaplastycznego oraz glejaka wielopostaciowego w kontekście ich inwazyjności stanowiącej jeden z kluczowych

mechanizmów odpowiedzialnych za oporność w/w guzów na standardowe strategie terapeutyczne.

W dyskusji Autor rekapitułuje uzyskane wyniki na tle doniesień literaturowych i konfrontuje uzyskane wyniki z rezultatami badań innych autorów. Pomimo swojej obszerności dyskusja wydaje się jednak nie wyczerpywać potencjału danych prezentowanych w rozdziale Wyniki. W odczuciu Recenzenta zgromadzony materiał zasługuje na bardziej szczegółowe omówienie, szczególnie wartościowym byłoby przedyskutowanie uzyskanych, obiecujących wyników w kontekście wykorzystanego systemu badawczego i związanych z nim ograniczeń. Wcześniejsze badania z zastosowaniem innych rodzajów inhibitorów szlaków metabolicznych (np. inhibitorów szlaku EGF czy też mTOR) nie wykazały żadnych korzyści w badaniach klinicznych pomimo bardzo obiecujących wyników badań *in vitro*. W tym kontekście uzyskane przez Doktoranta wyniki powinny zostać przedyskutowane w aspekcie ograniczeń stosowanego systemu *in vitro* z propozycjami wykorzystania bardziej zaawansowanych modeli badawczych takich jak pierwotne hodowle komórkowe i organotypowe skrawki materiału pobranego od pacjenta z nowotworem glejowym OUN czy też modele zwierzęce (ortotopowe z zastosowaniem pierwotnych hodowli komórkowych bądź też optymalnie syngeniczne) jako obiecujących płaszczyzn badawczych opartych na uzyskanych przez Autora wynikach.

We Wnioskach będących podsumowaniem przeprowadzonej wcześniej analizy naukowej Autor wskazuje na fakt, że zastosowane inhibitory i chemioterapeutyki skutecznie indukowały zaprogramowaną śmierć w komórkach gwiazdziaka anaplastycznego oraz glejaka wielopostaciowego, przy czym równoczesna inkubacja okazała się być skuteczniejsza niż pojedyncza aplikacja a skojarzone działanie niektórych z nich inicjowało głównie apoptozę, przebiegającą szlakiem wewnątrzpochodnym czemu nie towarzyszyły zmiany martwicze. Efekt ten wymagał jednak różnych kombinacji inhibitorów w zależności od podtypu histopatologicznego guza glejopochodnego. W kolejny z wniosków Doktorant podkreśla rolę jaką kompleks bcl-2:beklina 1 odgrywa w przekierowywaniu sygnałów pomiędzy korzystnym i niekorzystnym z rokowniczego punktu widzenia mechanizmem śmierci komórek (odpowiednio apoptozą i autofagią) w komórkach linii złośliwych guzów glejopochodnych; w tym kontekście szczególnie interesującą jest informacja o związku tego efektu ze zmianą lokalizacji tych białek w obrębie komórki. Ostatni z wniosków wskazuje na dodatkowy, istotny mechanizm działania

przeciwnowotworowego zastosowanych inhibitorów w kombinacji z cytostatykiem jakim jest skuteczne hamowanie migracji komórek badanych linii.

Całość rozprawy doktorskiej mgr Adriana Zająca oceniam wysoko, Doktorant dowiódł, że jest dojrzałym badaczem, potrafiącym dobrać ciekawy temat badawczy o dużym znaczeniu poznawczym i praktycznym. Zebrany materiał został w prawidłowy sposób przeanalizowany oraz stał się podstawą do wyciągnięcia prawidłowych, logicznych wniosków. W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych z wnioskiem o dopuszczenia mgr Adriana Zająca do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*prof. Andrzej Kozłowski*