

---

**Prof. dr hab. med. Dorota Dworakowska**

Katedra i Klinika Nadciśnienia tętniczego i Diabetologii  
Gdański Uniwersytet Medyczny (GUMed)  
Ul. Dębinki 7c, 80-952 Gdańsk  
Email: [ddw@gumed.edu.pl](mailto:ddw@gumed.edu.pl)

**Honorary senior clinical lecturer in cancer studies**

Richard Dimbleby Department of Cancer Research  
King's College London, 2.32 New Hunt's House  
London SE1 1UL, UK  
Email: [info@professordworakowska.co.uk](mailto:info@professordworakowska.co.uk)

**Prof. Dorota Dworakowska MD (Hons.) PhD MRCP UK (Endocrinology & Diabetes)**

Consultant in endocrinology, diabetes and general/internal medicine  
London International Clinic  
25 Harley Street, W1G 9QW London, UK  
Email: [admin@londoninternationalclinic.co.uk](mailto:admin@londoninternationalclinic.co.uk)

Londyn, 29 czerwca 2020

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pana mgr Adriana Zająca  
pod tytułem:

**Temozolomid oraz inhibitory szlaków zależnych od receptora TrkB w indukcji zaprogramowanej śmierci ludzkich komórek glejaka *in vitro***

Ocena wpływu temozolomidu oraz inhibitorów szlaków zależnych od receptora TrkB na indukcję apoptozy ludzkich komórek glejaka w warunkach *in vitro* ma istotne znaczenie zarówno z punktu widzenia klinicznego, jak i naukowego. Potencjalnie ważną rolę w transformacji i złośliwości glejaków odgrywają szlaki regulowane przez receptor TrkB: PI3K-Akt/PKB-mTOR, Ras-Raf-MEK-ERK oraz PLC $\gamma$ 1-PKC. Dlatego cenne było podjęcie przez doktoranta próby oceny przeciwnowotworowych właściwości szeregu nowych związków farmakologicznych (LY294002, sorafenibu, Temozolomidu, U-73122 oraz LOXO-101), używanych pojedynczo jak i w terapii skojarzonej, w eliminacji ludzkich komórek glejaka.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska ma 120 stron i ma standardowy układ, składający się z: wstępu, celów pracy, opisu materiału i metod, wyników, dyskusji, podsumowania, wniosków, piśmiennictwa, spisu tabel i rycin, jak również streszczenia w wersji polskiej i angielskiej.

Praca napisana jest płynnie, zaś poziom używanego języka, składni oraz zwrotów stylistycznych wskazuje na doświadczenie doktoranta w badanym zagadnieniu.

We wstępie doktorant omawia szczegółowo nowotwory pochodzenia glejowego, szczególnie gwoździaka anaplastycznego oraz glejaka wielopostaciowego. Dokładnie opisuje też egzo- i endogenne czynniki etiologiczne oraz obecne metody leczenia.

Kolejna część dotyczy molekularnych mechanizmów transformacji nowotworowej glejaków, z analizą wewnątrz-komórkowych szlaków przekazywania sygnału przeżycia, regulowanych przez receptor TrkB. Omówione zostały również inhibitory

---

tych szlaków w tym Larotrectinib (LOXO-101), LY294002, Sorafenib, U-73122 jak również temozolomid.

Następny podrozdział dotyczy śmierci komórkowej, gdzie doktorant skupił się na procesach apoptozy, autofagii, nekrozy oraz korelacji pomiędzy tymi mechanizmami śmierci.

Doktorant stawia sobie następujące cele badawcze:

1. Ocenę skuteczności LY294002, sorafenibu, Temozolomidu, U-73122 oraz LOXO-101 w inicjacji zaprogramowaną śmierci komórek glejaka
2. Ocenę potencjalnej korzyści terapeutycznej ze skojarzonego działania badanych substancji w porównaniu do mono-terapii
3. Dokładniejsze poznanie molekularnych mechanizmu indukcji zaprogramowanej śmierci komórki pod wpływem badanych związków, ze szczególnym uwzględnieniem roli kompleksu białek Bcl-2 i beklina-1 w eliminowaniu komórek nowotworowych na drodze apoptozy lub autofagii
4. Ocenę wpływu mono-terapii oraz terapii skojarzonej (LY294002, sorafenibu, Temozolomidu, U-73122 oraz LOXO-101) na hamowanie migracji komórek glejaka

Badania prowadzone były na komercyjnie dostępnych liniach ludzkich komórek glejaka: **gwiazdziaka anaplastycznego** (ang. *anaplastic astrocytoma*, AA) MOGGCCM (III stopień złośliwości wg WHO) oraz **glejaka wielopostaciowego** (ang. *glioblastoma multiforme*, GBM) – T98G (IV stopień złośliwości wg WHO).

Metody eksperymentów zostały przedstawione w sposób, który pozwoli innym badaczom na powtórzenie przeprowadzonych badań. W analizie statystycznej wykorzystano test jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (*one-way ANOVA*) z testem post-hoc Dunnett'a przy użyciu programu GraphPad Prism (*GraphPad Software Inc., USA*).

Uzyskane wyniki wykazały, iż zastosowane związki skutecznie indukowały zaprogramowaną śmierć komórek w obu liniach, a także hamowały ich migrację. W przypadku autofagii wiązało się to ze wzrostem poziomu ekspresji markera – bekliny-1, a w komórkach apoptotycznych obserwowano wzrost ekspresji i aktywności kaspaz 3, 8 oraz 9.

Terapia skojarzona okazała się być skuteczniejsza w eliminacji komórek glejaka w porównaniu do monoterapii, a komórki glejaka wielopostaciowego były bardziej wrażliwe na zastosowaną terapię niż gwiazdziaka anaplastycznego.

W przypadku linii MOGGCCM najwięcej komórek apoptotycznych obserwowano po zastosowaniu kombinacji LY294002, U-73122 i Temozolomidu, co może świadczyć o potencjalnym zaangażowaniu szlaków PI3K-Akt/PKB-mTOR oraz PLC $\gamma$ 1-PKC w oporność gwiazdziaka anaplastycznego.

Z kolei w linii T98G największą ilość martwych komórek (na drodze zaprogramowanej śmierci) odnotowano po równoczesnej inkubacji z LY294002, sorafenibem i Temozolomidem, co może sugerować, że oporność glejaka

---

wielopostaciowego związana jest z pobudzaniem szlaków PI3K-Akt/PKB- mTOR i Ras-Raf-MEK-ERK.

Innowacyjny eksperyment zablokowania ekspresji PI3K, Raf, PLC $\gamma$ 1 oraz TrkB przy użyciu specyficznych siRNA dostarczył potencjalnych przesłanek na zaangażowanie badanych szlaków w mechanizmie oporności glejaków na indukcję zaprogramowanej śmierci oraz prawdopodobną skuteczność inhibitorów w blokowaniu sygnału przeżycia i uwrażliwianiu komórek nowotworowych na indukcję apoptozy.

Na podstawie przeprowadzonych badań, doktorant wysunął następujące wnioski, które odpowiadają postawionym początkowo celom badawczym:

1. Wrażliwość komórek glejaków na indukcję zaprogramowanej śmierci zależy od linii komórkowej oraz rodzaju zastosowanego związku.
2. LY294002, sorafenib, Temozolomid, U-73122 oraz LOXO-101 skutecznie indukuje zaprogramowaną śmierć w komórkach gwiaździstaka anaplastycznego oraz glejaka wielopostaciowego, a równoczesna inkubacja okazała się być skuteczniejsza niż mono-terapia.
3. Skojarzone działanie LY294002, sorafenibu, U-73122, LOXO-101 oraz TMZ inicjuje głównie apoptozę a nie nekrozę.
4. Zablokowanie szlaków PI3K-Akt/PKB-mTOR oraz PLC $\gamma$ 1-PKC przy użyciu ich inhibitorów i Temozolomidu, skutecznie eliminuje komórki linii MOGGCCM na drodze apoptozy. Z kolei w komórkach T98G kluczową rolę w tym procesie może odgrywać przerwanie transdukcji sygnałów przekazywanych poprzez szlaki PI3K-Akt/PKB- mTOR oraz Ras-Raf-MEK-ERK.
5. Kompleks bcl-2:beklina 1 odgrywa istotną rolę w przekierowywaniu sygnałów pomiędzy apoptozą a autofagią w komórkach glejaka, co może być związane ze zmianą lokalizacji tych białek w obrębie komórki.
6. Inhibitory szlaków PI3K-Akt/PKB-mTOR oraz Ras-Raf-MEK-ERK (LY294002 i sorafenib) w połączeniu z Temozolomidem skutecznie hamują migrację komórek glejaka III i IV stopnia.

W dyskusji doktorant odnosi się do uzyskanych wyników. Na uwagę zwraca 108 pozycji starannie dobrane piśmiennictwo w języku angielskim, obejmujące również najnowsze pozycje z ostatnich lat, w tym prace z udziałem Pani Promotor, Pani Promotor pomocniczej oraz jedna z udziałem doktoranta, opublikowane w najlepszych światowych czasopismach.

**Jakubowicz-Gil J., Langner E.**, Bądziul D., Wertel I., Rzeski W. (2013). **Apoptosis induction in human glioblastoma multiforme T98G cells upon temozolomide and quercetin treatment.** *Tumor Biology*, 34(4): 2367–2378.

**Jakubowicz-Gil J., Bądziul D., Langner E.**, Wertel I., **Zajac A.**, Rzeski, W. (2017). **Temozolomide and sorafenib as programmed cell death inducers of human glioma cells.** *Pharmacological Reports*, 69(4): 779–787.

**Jakubowicz-Gil J., Langner E.**, Wertel I., Piersiak T., Rzeski W. (2010). **Temozolomide, quercetin and cell death in the MOGGCCM astrocytoma cell line.** *Chemico-Biological Interactions*, 188(1): 190–203.

---

**Jakubowicz-Gil J., Langner E.,** Bądziul D., Wertel I., Rzeski W. (2014). **Quercetin and sorafenib as a novel and effective couple in programmed cell death induction in human gliomas.** *Neurotoxicity Research*, 26(1): 64–77.

Na szczególną pochwałę zasługuje cytowanie znakomitych prac polskich autorów, opublikowanych zarówno w polskich jak i zagranicznych czasopismach naukowych. Zarówno ilość, jak i różnorodność oraz dobór pozycji piśmiennictwa świadczy o bardzo szerokiej wiedzy doktoranta w zakresie omawianych zagadnień.

Obecność Pani Promotor widoczna jest na każdym etapie pracy. Pani Prof. Jakubowicz-Gil przekazuje swoją wiedzę i umiejętności kolejnym pokoleniom, wzmacniając pozycje polskiej nauki w kraju oraz na arenie międzynarodowej. Na uwagę zasługuje również ranga ośrodka, w którym wykonano badania oraz umiejętność pracy zespołowej oraz mistrzowski warsztat badawczy Pani Promotor.

Z obowiązku recenzenta, przedstawiam drobne uwagi krytyczne, które nie wpływają na moją pozytywną ocenę pracy:

1. Część terminologii, która była tłumaczona z języka angielskiego, mogłaby być częściej wrażona jako skrót, ułatwiłoby to czytanie i rozumienie tekstu
2. Warto byłoby umieścić spis używanych skrótów
3. Brak jest informacji o finansowaniu badania a jest to istotna informacja i wymaga podkreślenia oraz pisemnych podziękowań w maszynopisie
4. Część wniosków i wyników wyrażone jest zbyt śmiało (niemal z pewnością) a powinno się raczej użyć trybu przypuszczającego (np. prawdopodobnie)
5. Część wyników i wniosków, wyrażona w tekście, jest mało przejrzysta i wymagałaby dalszej pracy nad tekstem, aby był krótszy i bardziej przejrzysty
6. Doktorant używa szeregu terminów zastępczych (rysunki, zdjęcia, figury, literatura), które standardowo nazywa się rycinami i piśmiennictwem

**W podsumowaniu, prezentowana rozprawa doktorska wnosi istotny i innowacyjny wkład do badań nad terapiami celowanymi w leczeniu glejaka w modelu przedklinicznym, zaś uzyskane wyniki są oryginalne oraz mogą mieć potencjalne zastosowanie kliniczne. Rozprawa spełnia warunki ustawowe, w tym oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazanie ogólnej wiedzy teoretycznej kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym, z ogromną przyjemnością, wnioskuję o dopuszczenie mgr Adriana Zająca do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Prof. dr hab. n. med. Dorota Dworakowska



Członek Polskiej Akademii Nauk (sekcja nauk klinicznych)  
Członek Królewskiego Kolegium Lekarskiego (Wielka Brytania)  
(*Royal College of Physicians, UK*)