

Zielona Góra, 15 stycznia 2024

dr hab. *prof.* UZ Beata Machnicka
Katedra Biotechnologii
Instytut Nauk Biologicznych
Uniwersytet Zielonogórski

Recenzja rozprawy doktorskiej

lek. Agaty Forkasiewicz

**pt.: „Rola białka LDH-A w ucieczce przed apoptozą komórek raka przelyku
w odpowiedzi na TNF- α ”**

**wykonanej na Wydziale Nauk Medycznych
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Augoff**

1. OCENA MERYTORTCZNA PRACY

A. Temat pracy, trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi wartościowe wyniki o charakterze podstawowym stanowiącym obiecujący potencjał aplikacyjny, uzyskane dzięki kontynuowaniu badań promotora pracy dr hab. Katarzyny Augoff w dziedzinie badania roli plejotropowego czynnika martwicy nowotworów TNF- α w procesie nowotworzenia. Wpisują się one w wieloletnie i intensywne poszukiwania w świecie nauki mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój i biologię nowotworów co może przyczynić się do opracowania nowych, skuteczniejszych, tak bardzo oczekiwanych terapii tych schorzeń.

Czynnik martwicy nowotworu TNF- α to wielofunkcyjna cytokina odgrywająca ważną rolę w różnorodnych zdarzeniach komórkowych, takich jak przeżycie, proliferacja, różnicowanie i śmierć komórek. Jako cytokina prozapalna jest wydzielana przez komórki zapalne, które mogą brać udział w karcynogenezie związanej ze stanem zapalnym. TNF pełni swoje funkcje biologiczne poprzez aktywację odrębnych szlaków sygnalizacyjnych, takich jak czynnik jądrowy κ B (NF- κ B) i N-końcowa kinaza c-Jun (JNK). NF- κ B jest głównym sygnałem przeżycia komórki, który ma działanie antyapoptotyczne, podczas gdy utrzymująca się aktywacja JNK przyczynia się do śmierci komórki. Jeśli chodzi o nowotworzenie, to TNF znany jest właśnie jako podwójny gracz. Z jednej strony może być endogennym promotorem nowotworu, ponieważ stymuluje wzrost, proliferację, inwazję i przerzuty komórek nowotworowych oraz angiogenezę nowotworu. Z drugiej strony TNF może być zabójcą raka. To właśnie ta właściwość TNF w wywoływaniu śmierci komórek nowotworowych czyni go potencjalnym lekiem przeciwnowotworowym. Ostatnie badania skupiają się na uwrażliwianiu komórek nowotworowych na apoptozę indukowaną TNF.

Założeniem prezentowanej rozprawy jest stwierdzenie, że mechanizmy determinujące antyapoptotyczny efekt działania cytokiny prozapalnej TNF- α , są wciąż słabo poznane a komórki nowotworowe nie są wrażliwe na cytotoksyczne działanie tego czynnika. Cytokina TNF- α w normalnym stanie fizjologicznym eliminuje

uszkodzone komórki gospodarza włączając proces apoptozy, jednak w komórkach nowotworowych uczestniczy w podtrzymywaniu ich proliferacji, zwiększając ich potencjał migracyjny i inwazyjny. Wiążąc to zjawisko z przeprogramowaniem metabolicznym, w którym główną rolę odgrywa wzrost produkcji mleczanu oraz metaloproteinaz Autorka zadaje pytanie, czy zmiany metaboliczne związane z adaptacją metabolizmu zależnego od dehydrogenazy mleczanowej LDH przez komórki nowotworowe mają wpływ na uruchamianie systemów blokujących zewnątrzkomórkowy sygnał (bądź sygnały) do apoptozy, w tym zdolność przełączania ścieżki transmisji sygnału stymulowanego przez TNF- α z proapoptotycznego na promujący przeżycie?

Rak przełyku jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów złośliwych. W jego patogenezie bierze udział wiele czynników, w tym utrzymujący się stan zapalny, obecnie uznawany za jeden z dziesięciu znaków szczególnych nowotworów. Ze względu na złożoność zjawiska nabywania przez komórki nowotworowe oporności na proapoptyczne działanie czynnika TNF- α oraz potrzeby poszukiwania nowych celów terapeutycznych, dogłębne poznanie biologii nowotworów a w konsekwencji skuteczniejsze leczenie raka przełyku, stanowi niezwykle aktualne zadanie dla badań biomedycznych.

Rozprawa doktorska lek. Agaty Forkasiewicz jest przykładem kontynuacji wieloletnich prac zespołu zajmującego się badaniem roli dehydrogenazy mleczanowej oraz czynnika martwicy nowotworów TNF- α w procesie nowotworzenia.

Wykorzystując model linii komórkowych raka przełyku KYSE150 oraz EC7 oraz wycinki tkankowe pobrane podczas resekcji przełyku Autorka postawiła sobie jako główny cel pracy ocenę udziału dehydrogenazy mleczanowej (LDHA) w ucieczce komórek nowotworowych przed apoptozą, indukowaną cytokiną prozapalną TNF- α

Cel te zamierzała osiągnąć poprzez szereg szczegółowych badań jakimi były:

- analiza ekspresji genów *LDHA*, *LDHB*, *TNFA*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B* oraz *MMP9* w komórkach raka przełyku
- analiza zmian produkcji białka LDHA w tkankach raka przełyku
- analiza wpływu TNF- α na poziom LDH w komórkach linii komórkowych raka przełyku KYSE150 i EC7
- analiza wpływu wyciszenia ekspresji genu *LDHA* na uwrażliwienie komórek raka przełyku na proapoptyczne działanie TNF- α
- sprawdzenie czy oksamat sodu odblokuje apoptozę i hamuje proliferację zależną od TNF- α oraz czy wpływa na wydzielanie kwasu mlekowego w komórkach raka przełyku
- sprawdzenie czy zahamowanie aktywności LDHA wpływa na indukowaną przez TNF- α migrację komórek oraz sekrecję MMP9 w komórkach raka przełyku

B. Uzyskane rezultaty i ich znaczenie dla nauki i praktyki

W pierwszej części badań, Doktorantka dokładnie przeanalizowała poziom ekspresji genów kodujących: czynnik martwicy nowotworu α (*TNFA*), podjednostki dehydrogenazy mleczanowej (*LDHA* i *LDHB*), receptory 1 i 2 czynnika martwicy nowotworu α (*TNFRSF1A* i *TNFRSF1B*) oraz metaloproteinazy (*MMP9*) w komórkach raka przełyku wykorzystując dostępne dane w internetowej bazie TNMplot

i porównała je do poziomu wyznaczonego dla tkanek kontrolnych bez nowotworów oraz tkanek guzów przerzutowych. Następnie Doktorantka sprawdziła poziom produkcji dehydrogenazy mleczanowej A analizując skrawki parafinowe barwione metodą immunohistochemiczną wykorzystując w tym celu specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko LDHA. W wyniku tych analiz Autorka zaobserwowała znaczące różnice w poziomie ekspresji poszczególnych genów w odniesieniu do tkanek kontrolnych. Ekspresja genów *LDHA* i *LDHB* jest istotnie większa w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

Wyniki te potwierdza zwiększona ilość białka LDHA w analizowanych skrawkach tkanek nowotworowych. Ponadto Autorka zaobserwowała w komórkach przerzutowych raka przełyku zwiększony poziom ekspresji genów kodujących obie podjednostki TNF oraz MMP9.

W toku dalszych badań, Doktorantka analizowała wpływ czynnika TNF- α na poziom LDH w komórkach raka przełyku. Modelem badawczym w tym cyklu eksperymentów były linie komórkowe: KYSE150 - ludzka linia komórkowa płaskonabłonkowego raka przełyku oraz linia komórkowa EC7 wyprowadzona z tkanki nowotworowej raka gruczołowego przełyku. Używając techniki RTqPCR do mierzenia zmian poziomów ekspresji genów kodujących podjednostkę A i B dehydrogenazy mleczanowej w tych liniach Doktorantka dochodzi do wniosku, że TNF- α indukuje wzrost ekspresji obu genów. Natomiast wyciszenie ekspresji genu kodującego LDHA techniką siRNA nie powoduje uwrażliwienia komórek raka przełyku na proapoptotyczne działanie TNF- α .

W kolejnej części prezentowanych wyników, Doktorantka używając oksamatu sodu jako inhibitora specyficznego dla LDHA w hodowlach badanych linii komórkowych raka przełyku stwierdza, że brak aktywności izoformy LD5 co prawda nie odblokowuje apoptozy ale wpływa na hamowanie proliferacji zależnej od TNF- α oraz znacznie zmniejsza wydzielanie kwasu mlekowego w komórkach raka przełyku.

Podsumowując wyniki przedstawione w swojej dysertacji Autorka wysuwa poniższe wnioski:

1. Hamowanie aktywności LDHA w komórkach raka przełyku nie odblokowuje ścieżki apoptotycznej związanej z TNF- α , a więc nie generuje zmiany odpowiedzi komórkowej na TNF- α z pronowotworowej na antynowotworową.
2. Użycie specyficznego inhibitora LDHA znosi promigracyjny efekt TNF- α na komórki raka przełyku oraz hamuje indukowaną przez TNF- α sekrecję MMP9, co wiąże się z osłabieniem aktywacji ścieżki sygnałowej związanej z Erk1/2.
3. Pomiędzy statusem glukozy z skutecznością odpowiedzi komórek nowotworowych na pronowotworowe dzianie TNF- α istnieje bezpośrednia zależność.
4. Oksamat sodu skutecznie hamuje sekrecję mleczanu oraz działa antyproliferacyjnie na komórki raka przełyku.
5. Uzyskane wyniki dają podstawę do rozważenia zastosowania inhibitora LDHA w projektowaniu terapii uzupełniającej u pacjentów z rakiem przełyku.

C. Poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna

Dysertacja ma układ typowy i liczy 93 strony. Praca napisana jest poprawnym językiem naukowym i przy użyciu właściwej terminologii. Na uwagę zasługuje fakt precyzyjnego przedstawiania polskich nazw białek funkcjonujących w literaturze branżowej często tylko w skrótach pochodzących od nazw angielskich. Szczegółowa lektura pracy pozwoliła wykryć jedynie pojedyncze niedopatrzania. Edycja pracy jest prawidłowa, bardzo staranna i estetyczna (z oprawą włącznie).

2. OCENA METODOLOGICZNA PRACY

A. Dobór literatury, umiejętność wykorzystania źródeł

W swojej dysertacji Doktorantka zacytowała 222 publikacje, powołując się 6- krotnie na wyniki zespołu, w którym pracowała. Cytowane prace dobrane są prawidłowo i przedstawiają najnowsze odkrycia, w większości z ostatnich 10-15 lat z zakresu prezentowanego tematu.

B. Poprawność formułowania problemów i hipotez

W wyniku przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała 5 szczegółowych wniosków będących odpowiedzią na sformułowany wcześniej cel główny pracy, jakim była ocena udziału podjednostki A dehydrogenazy mleczanowej (LDHA) w ucieczce komórek nowotworowych przed apoptozą, indukowaną cytokiną prozapalną TNF- α na przykładzie komórek raka przełyku.

C. Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania

Modelem użytym w badaniach były dwie ludzkie linie komórkowe raka przełyku: KYSE150 i EC7. Ludzka linia komórkowa płaskonabłonkowego raka przełyku KYSE150 pozyskana została komercyjnie w Merck Leibniz- Institute DSMZ (ACC375). Natomiast linia komórkowa EC7 została wyprowadzona z tkanki nowotworowej raka gruczołowego przełyku pobranej w trakcie protezowania przełyku w Zakładzie Endoskopii Zabiegowej Katedry i Kliniki Chirurgii Ogólnej, Małoinwazyjnej i Endokrynologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Komórki zostały pobrane od 68-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej z wznową raka gruczołowego przełyku. Profil genetyczny tej linii został określony za pomocą analizy STR (Short Tandem Repeat) przez ATTC Cell Line Authentication Service. W dyskusji Autorka nadmienia, że komórki linii EC7 prezentują cechy macierzystych komórek nowotworowych w odróżnieniu od linii KYSE150.

Ponadto, część badań przeprowadzono na zatopionych w parafinie wycinkach tkankowych pobranych podczas resekcji przełyku w celach diagnostycznych. Przeprowadzone badania były wykonywane zgodnie z wytycznymi Deklaracji Helsińskiej oraz za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu nr 156/2018. Autorka nie podała jednak tematu, na który wydana została wspomniana zgoda.

Metody molekularne i cytochemiczne wykorzystywane w pracy w celu wyłączenia ekspresji genów, a następnie w analizie ekspresji genów i białek zostały dobrane prawidłowo i stanowią standardowe, nowoczesne techniki stosowane w tego typu analizach.

Analizę porównawczą poziomów ekspresji wybranych genów wykonała wykorzystując dane z internetowej bazy TNMplot: differentia gene expression analysis in Tumor, Normal and Metastatic tissues nieparametrycznym testem Manna-Whitneya oraz testem Dunna. W celu obniżenia ekspresji genu LDHA Doktorantka użyła techniki siRNA, a poziomy transkryptu wybranych genów badała z zastosowaniem reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) i ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR). Poziomy ekspresji badanych białek określała techniką Western blot a ekspresję białek w tkankach określała z zastosowaniem barwienia immunohistochemicznego. Ocenę proliferacji i apoptozy komórek raka przełyku Doktorantka wykonała za pomocą standardowego testu cytotoksyczności (MTT) oraz cytometrii przepływowej. Analizę aktywności metaloproteinazy MMP9 oraz składu izoenzymów LDH wykonała metodą zymografii, a pomiar stężenia mleczanu uwalnianego przez komórki analizowała spektrofotometrycznie.

Analizy zostały przeprowadzone całościowo, zakończone odpowiednią analizą statystyczną i dobrze zilustrowane graficznie.

D. Prawdliwość układu pracy i struktury podziału treści

Układ rozprawy doktorskiej Pani Agaty Forkasiewicz jest zgodny z normami przyjętymi do tego typu opracowań.

Recenzowana rozprawa składa się z kilku rozdziałów: Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wprowadzenia, Celu pracy, Wyników, Dyskusji, Wniosków, Materiałów i Metod oraz Literatury.

Rozdział zawierający wprowadzenie do tematu pracy napisany jest wyczerpująco i bardzo poprawie merytorycznie. Autorka ciekawie i logicznie przedstawia kolejno najnowsze doniesienia z tematyki prezentowanej pracy podsumowując przedstawione fakty jasnym celem pracy.

Rozdział przedstawiający wyniki jest dobrze przygotowany, zawiera właściwie przygotowaną do tego typu wyników dokumentację graficzną i tabelaryczną.

Końcowym, bardzo interesującym rozdziałem rozprawy jest dyskusja, którą Autorka przedstawiła w bardzo syntetyczny i merytoryczny sposób, zestawiając otrzymane wyniki z najnowszymi doniesieniami naukowymi w dziedzinie.

Dane uzyskane w toku realizacji projektu doktorskiego zostały wcześniej częściowo opublikowane w dwóch pracach: jednej przeglądowej (2020) oraz jednej doświadczalnej (2022). Obie prace zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR o wysokim współczynniku wpływu IF oraz dużej liści punktów MNiSW. Pierwsza praca została opublikowana w czasopiśmie *Cell Molecular Biological Letters* (IF – 8,702 i 100 pkt MNiSW). Wg informacji zawartych w publikacji Doktorantka jest w niej pierwszym autorem i uczestniczyła w pisaniu manuskryptu. Kolejna praca opublikowana została w czasopiśmie *Int J Mol Sci* (IF – 5,6 i 140 pkt MNiSW). Autorka i p. Wojciech Stach są w niej wspólnie pierwszymi autorami. W pracy tej Doktorantka przeprowadzała część eksperymentów, pisała manuskrypt oraz przygotowywała ryciny. Była również odpowiedzialna za pozyskanie funduszy na realizację projektu.

E. Uwagi i propozycje

Pracę dokorską lek. Agaty Forkasiewicz uważam za bardzo cenną i interesującą. Moja ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej jest bardzo wysoka. Przedstawiony cykl badań jest bardzo dobrze zaplanowanym zadaniem badawczym. Cele pracy zostały zrealizowane a część wyników opublikowana w wysoko punktowanym czasopiśmie.

Doktorantka przygotowując swoją dysertację nie ustrzegła się jednak błędów i nieścisłości.

1. Na wstępie prezentowanych wyników brak jest krótkiego opisu użytych linii komórkowych z zaznaczeniem kryterium ich wyboru w kontekście realizowanych doświadczeń. Użyte do badań linie komórkowe są co prawda opisane szczegółowo w rozdziale Materiały i metody ale na początku prezentowanych wyników ważne jest aby jasno określić dlaczego akurat te linie wybrano jako odpowiednie do zaplanowanych doświadczeń i czym one się różnią między sobą.
2. Moje zastrzeżenia wzbudzają prezentowane wyniki dotyczące wyciszenia ekspresji genu *LDHA*. Autorka opisuje na stronie 48, że skuteczność wyciszenia produkcji białka *LDHA* dla linii *KYSE150* wynosi 38% a dla linii *EC7* prawie 56%. Z analizy densymetrycznej umieszczonej na rycinie 6B wydaje

się ten wynik być odwrotny. Śmiem twierdzić, że w przypadku linii EC7 jest to nawet mniej niż podane 38%. Zamieszczona analiza zymograficzna (ryc. 6C) wydaje się też nie potwierdzać podanego liczbowo wyniku. Ponadto proszę o informację, w którym dniu po transfekcji badano skuteczność wyciszenia genu *LDHA* i jak długo ta wartość utrzymywała się w czasie.

3. Zdjęcia umieszczone w rycinie 10, a szczególnie 11 są bardzo ciemne co utrudnia ich interpretację. Być może rozjaśnienie lub inwersja kolorów pomogłaby w czytelniejszej ich prezentacji.

Ponadto, po lekturze przedstawionej dysertacji, pojawiły się zagadnienia, które chciałabym poddać dyskusji w trakcie wystąpienia:

- Autorka twierdzi we wniosku końcowym, że „uzyskanie przez nią wyniki dają podstawę do rozważenia zastosowania inhibitora LDHA w projektowaniu terapii uzupełniającej u pacjentów z rakiem przełyku”. Bardzo proszę o interpretację czy ma Pani na myśli tylko omawiany w pracy oksamat sodu jako analog pirogronianu, specyficznie hamujący aktywność podjednostki A dehydrogenazy mleczanowej czy może Pani również zaproponować inne inhibitory.
- Na jakiej podstawie Pani twierdzi, że komórki linii EC7 prezentują cechy macierzystych komórek nowotworowych? Jakimi cechami charakteryzują się te komórki i co je odróżnia od komórek linii KYSE150?

Analizując wyniki badań Doktorantki, ich zakres jak również znaczenie dla badań podstawowych nad biologią i terapią nowotworów przełyku stwierdzam, że praca doktorska pod tytułem „**Rola białka LDH-A w ucieczce przed apoptozą komórek raka przełyku w odpowiedzi na TNF- α** ” Pani lek. Agaty Forkasiewicz spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. art. 187 ust. 1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce - (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 z późn. zm.).

W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie lek. Agaty Forkasiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wartość naukową prezentowanych wyników oraz dorobek naukowy Autorki **wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lek. Agaty Forkasiewicz stosowną nagrodą.**

Kierownik Katedry Biotechnologii
Instytutu Nauk Biologicznych
B. Machnicka
dr hab. Beata Machnicka, prof. UZ