Szczecin, 20.07.2023

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Dariusza Rożkiewicza pt. "Ocena aktywności przeciwnowotworowej inhibitora kinazy Burtona i erytropoetyny w komórkach gruczolaka piersi" wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Dariusza Pawlaka oraz promotora pomocniczego dr hab. Justyny Hermanowicz z Zakładu Farmakodynamiki oraz Zakładu Farmacji Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Współczesna terapia raka piersi opiera się na multimodalnej strategii, która obejmuje zarówno interwencję miejscową (chirurgia, radioterapia) jak i postępowanie ogólnoustrojowe (chemioterapia, hormonoterapia i/lub immunoterapia). Skuteczna implementacja leczenia multimodalnego sprawia, że 5-letni wskaźnik przeżycia raka piersi wynosi >90% (zwłaszcza w przypadku dobrego rokowania, uwarunkowanego m. in. przez ekspresję receptorów estrogenowych). Jednakże rak piersi może mieć charakter nawrotowy, nawraca wiele lat po leczeniu, a 20-letni wskaźnik nawrotów raka piersi z dodatnim receptorem estrogenowym wynosi już od 10 do 41%. Dlatego też niezbędne jest poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych zwiększających końcowy sukces terapii.

Próby zastosowania inhibitorów kinazy tyrozynowej w leczeniu raka piersi, pomimo ich potencjalnych zalet takich jak niewielka kardiotoksyczność, przenikanie przez barierę krew-mózg w przypadku przerzutowego raka mózgu oraz doustna droga podania, przyniosły raczej rozczarowujące wyniki ze względu na brak swoistości i częste działania niepożądane. Jedynie niektóre z badanych inhibitorów kinazy tyrozynowej zostały zatwierdzone do stosowania w praktyce klinicznej z ograniczonymi wskazaniami w monoterapii lub leczeniu skojarzonym z innymi chemioterapeutykami lub lekami hormonalnymi. Stąd też poszukiwania innych kinaz jako celów terapeutycznych o potencjalnie większej skuteczności klinicznej. Jedną z możliwości stanowi kinaza tyrozynowa Burtona (BTK), której ekspresję stwierdza się w komórkach raka piersi (izoforma BTK-C). Ekspresja kinazy hamuje apoptozę komórek, a zahamowanie jej aktywności zapobiega rozwojowi agresywnych i szybko postępujących guzów raka piersi. Wadą klinicznie stosowanych inhibitorów kinazy Burtona jest rozwój oporności, obserwowany nawet u ok. 60% leczonych. Szansą na zwiększenie skuteczności teraputycznej inhibitorów kinazy Burtona jest więc terapia skojarzona. Jedną z pojawiających się możliwości terapeutycznych stanowi modulacja aktywności receptora dla erytropoetyny (Epo). Badania kliniczne sugerują, że rekombinowana ludzka erytropoetyna potęguje działanie leków

przeciwnowotworowych. Dlatego też badania mające na celu określenie przeciwnowotworowej aktywności inhibitora kinazy Burtona (LFM-A13) i erytropoetyny wobec komórek raka piersi oraz zdefiniowanie molekularnych mechanizmów ich działania w modelach eksperymentalnych są jak najbardziej uzasadnione.

Na rozprawę doktorską mgr Dariusza Rożkiewicza składają się dwie opublikowane prace, praca oryginalna: Rozkiewicz D, Hermanowicz JM, Kwiatkowska I, Krupa A, Pawlak D. Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors (BTKIs): Review of Preclinical Studies and Evaluation of Clinical Trials. Molecules. 2023;28(5):2400 oraz praca poglądowa: Rozkiewicz D, Hermanowicz JM, Tankiewicz-Kwedlo A, Sieklucka B, Pawlak K, Czarnomysy R, Bielawski K, Surazynski A, Kalafut J, Przybyszewska A, Koda M, Jakubowska K, Rivero-Muller A, Pawlak D. The intensification of anticancer activity of LFM-A13 by erythropoietin as a possible option for inhibition of breast cancer. J Enzyme Inhib Med Chem. 2020;35(1):1697-1711. W obu ww. pracach Doktorant jest pierwszym autorem, jego udział w powstaniu każdej z powyżej wymienionych prac wynosi 60-70%%, co zostało potwierdzone przez pozostałych współautorów poszczególnych prac. Ponadto przedłożona do oceny praca zawiera następujące rozdziały: wprowadzenie, określenie celu pracy wraz z uzasadnieniem, materiały i metody badawcze, omówienie wyników badań z dyskusją oraz wnioski jak również streszczenia w języku polskim i angielskim. Uzupełnienie struktury rozprawy stanowią załączniki (omawiane publikacje, oświadczenia współautorów publikacji, zgoda komisji bioetycznej oraz prezentacja dorobku naukowego Doktoranta).

We Wprowadzeniu Doktorant przedstawił charakterystykę epidemiologiczną raka piersi oraz metody terapii (również multimodalnej). Następny podrozdział zawiera informacje dotyczące patofizjologii raka piersi ze szczególnym uwzględnieniem roli kinaz, w tym izoform kinazy tyrozynowej Burtona oraz inhibitorów kinazy (również LFM-A13). Ostatni podrozdział Wprowadzenia poświęcono potencjalnej roli erytropoetyny jako czynnika zwiększającego skuteczność terapii przeciwnowotworowej. Informacje przedstawione we wstępie uzasadniają w pełni zakres badań stanowiących podstawę pracy doktorskiej opracowanej przez mgr Dariusza Rożkiewicza. Należy również zauważyć, że obszerna charakterystyka kinazy tyrozynowej Burtona została przedstawiona w pracy poglądowej: Rozkiewicz D, Hermanowicz JM, Kwiatkowska I, Krupa A, Pawlak D. Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors (BTKIs): Review of Preclinical Studies and Evaluation of Clinical Trials. Molecules. 2023;28(5):2400.

W oparciu o przesłanki zawarte we wprowadzeniu Doktorant sformułował następujące cele badawcze: 1) ocena przeciwnowotworowej aktywności inhibitora kinazy tyrozynowej Burtona (LFM-A13) i erytropoetyny (Epo) wobec komórek raka piersi w modelu *Danio rerio*; 2) ocena żywotności estrogenozależnych (MCF-7) i estrogenoniezależnych (MDA-MB-231) komórek raka piersi po ekspozycji na LFM-A13 oraz Epo; 3) ocena

wpływu LFM-A13 i Epo na proces apoptozy oraz cykl komórkowy; 4) ocena udziału kinazy BTK w mechanizmie działania LFM-A13 i Epo.

Dla zrealizowania postawionych celów Doktorant przeprowadził szereg badań eksperymentalnych: *in vitro* używając modelu komórkowego raka piersi – estrogenozależnego (linia komórkowa MCF-7) i estrogenoniezależnego (linia komórkowa MDA-MB-231) oraz w modelu zwierzęcym danio pręgowanego (*Danio rerio*). W celu oceny wpływu aktywności LFM-A13 i Epo wobec raka piersi, model komórkowy ww. nowotworu, tj. linie komórkowe estrogenozależna - MCF-7 i estrogenoniezależna - MDA-MB-231, poddano ekspozycji na LFM-A13 w stężeniach 10, 30 i 100 µM i Epo beta w stężeniach 10, 30 i 100 IU/ml oraz w postępowaniu skojarzonym LFM-A13 i Epo beta. Wpływ na proliferację komórek oznaczano przy użyciu standardowego testu MTT, określając jednocześnie charakter interakcji Epo-LFM-A13 za pomocą analizy wskaźnika kombinacji. Wpływ na cykl komórkowy badanych związków oznaczano metodą cytometrii przepływowej - ocena wiązania aneksyny V. Metodę Western blot zastosowano do oznaczenia poziomu białek stosując przeciwciała: mysie monoklonalnym przeciwko BTK, królicze poliklonalne przeciwko fosfo BTK, królicze poliklonalne przeciwko kaspazie-6, królicze monoklonalne przeciwko cyklinie D1 oraz mysie monoklonalne przeciwko beta-aktynie (kontrola). Immunofluorescencję i mikroskopię konfokalną zastosowano do określenia cech wrzeciona linii komórkowych MCF-7 i MDA-MB-231 traktowanych Epo, LFM-A13 i Epo + LFM-A13. W modelu *Danio rerio* (zarodki) dokonano oceny aktywności przeciwnowotworowej LFM-A13 i erytropoetyny wobec komórek raka piersi wyznakowanych CM-Dil (*in vivo*). Ksenoprzeszczepy MCF-7 i MDA-MB-231 poddane ekspozycji na Epo beta (100 IU/ml) i LFM-A13 (100 µM) analizowano pod kątem intensywności fluorescencji cytoplazmatycznej. Immunoekspresję kinazy Brutona, HER2, receptorów progesteronowych, receptora estrogenowego alfa i Ki-67 oceniano również w próbkach raka piersi pacjentek poddanych częściowej lub całkowitej mastektomii z powodu pierwotnego raka piersi. Ocenę barwienia immunologicznego dla badanego białka analizowano za pomocą mikroskopii świetlnej i oceniano średni odsetek komórek nowotworowych z pozytywnym wybarwieniem. Sposób zaplanowania badań świadczy o bardzo dobrym merytorycznym przygotowaniu Doktoranta i umiejętności opanowania wielu technik laboratoryjnych.

Po przeprowadzeniu szeregu dobrze zaprojektowanych doświadczeń Doktorant wykazał m.in., że Epo i LFM-A13 zmniejszają proliferację komórek MCF-7 i MDA-MB-231 i hamują rozwój guza, a ich łączne zastosowanie wykazywało silniejsze działanie, o charakterze synergistycznym w komórkach MDA-MB-231 oraz addytywnym/synergistycznym w przypadku linii MCF-7. W kolejnym cyklu eksperymentów Doktorant wykazał, że połączenie Epo-LFM-A13 nasila apoptozę poprzez utratę potencjału błony mitochondrialnej (wzrost odsetka komórek MCF-7 i MDA-MB-231 o obniżonym potencjale przezbłonowym mitochondriów) i eksternalizację fosfatydyloseryny (przy silniejszym efekcie łącznej ekspozycji na Epo-LFM-A13) oraz wzrostu

ekspresji kaspazy-6 (LFM-A13 z Epo powodowało silniejszą regulację w górę ekspresji, zwłaszcza w komórkach MDA-MB-231). Ekspozycja na Epo/LFM-A13 skutkowała również zmniejszeniem frakcji fazy S i nieznacznym wzrostem fazy G0/G1 komórek MCF-7 i MDA-MB-231. Badania immunohistochemiczne komórek ludzkiego raka piersi wykazały ekspresję BTK (ok. 60% przypadków; w przypadku węzłów chłonnych ok. 70%) głównie w cytoplazmie komórek nowotworowych, ale także w części przypadków w jądrze i obszarze okołojądrowym, o raczej zwiększonej sile ekspresji w guzie pierwotnym. Warto odnotować, że guzy pierwotne BTK-dodatnie rozwinęły przerzuty BTK-ujemne do regionalnych węzłów chłonnych w 13% przypadków, natomiast 37% guzów pierwotnych BTK-ujemnych wytwarzało przerzuty BTK-dodatnie. Nie wykazano istotnego związku pomiędzy poziomem BTK w guzie pierwotnym i przerzutach do węzłów chłonnych a parametrami takimi jak wiek, stopień zaawansowania nowotworu, wielkość guza pierwotnego, ekspresja HER2 oraz receptorów estrogenowych i progesteronowych (receptory estrogenowe i progesteronowe zdefiniowano w ok. 65% próbkach) i jak również Ki-67.

Omówienie wyników jest prowadzone dojrzale, uwzględnia aktualny stan wiedzy i zostało zawarte w pracy oryginalnej oraz pewne odniesienia znajdują się również w opublikowanej pracy przeglądowej.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autor przedstawił cztery wnioski: 1) inhibitor kinazy Burtona (LFM-A13) skutecznie zmniejsza żywotność estrogenozależnych (MCF-7) i estrogenoniezależnych (MDA-MB-231) komórek raka piersi; 2) jednoczesna ekspozycja komórek raka piersi na LFM-13 oraz Epo skutkuje wzmocnieniem farmakologicznej aktywności przeciwnowotworowej inhibitora kinazy Burtona. Epo może być chemosensybilizatorem w terapii raka piersi; 3) jednoczesne podanie LFM-13 oraz Epo nasila proces apoptozy na drodze utraty potencjału błony mitochondrialnej oraz eksternalizacji fosfatydyloseryny; 4) kompilacja LFM-13 oraz Epo powoduje zahamowanie cyklu komórki raka piersi w fazie G1-S. Sformułowane przez Doktoranta wnioski dobrze oddają uzyskane wyniki, wynikają bezpośrednio z analizy danych uzyskanych w czasie realizacji badań. Jednakże istotna z punktu widzenia klinicznego obserwacja dokumentująca odmienną ekspresję BTK w guzie pierwotnym i komórkach przerzutowych raka piersi mogłaby stanowić jeden z końcowych wniosków.

Reasumując należy stwierdzić, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są oryginalnym osiągnięciem Autora, który dobrze opanował niełatwy warsztat badawczy i wykazał dobre merytoryczne przygotowanie. Uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi znaczący dorobek z elementami nowości naukowych i w pełni spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Dlatego też zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Dariusza Rożkiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na bardzo wysoki poziom merytoryczny pracy,

docenionej również przez grono międzynarodowych ekspertów, wnioskuję o wyróżnienie pracy *summa cum laude*. Wyniki pracy opublikowano w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *J Enzyme Inhib Med Chem* (IF=4,927) oraz *Molecules* (IF 5,051).

Prof. dr hab. n. med. Marek Droździk