

Recenzja
rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Kusaczuk
pt. „Zastosowanie wybranych inhibitorów deacetylaz histonów jako
farmakologicznych modulatorów epigenetycznych w badaniach na komórkach
glejaka wielopostaciowego mózgu”

wykonanej pod kierunkiem Promotora Pani dr hab. Marzanny Cechowskiej-Pasko w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Przedłożona do oceny rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych dotyczy istotnych zagadnień związanych z poznaniem wpływu wybranych przedstawicieli inhibitorów deacetylaz histonów (*histone deacetylase inhibitors*, HDIs) – pochodnej kwasu masłowego - kwasu 4-fenylomasłowego (PBA) i pochodnej kwasu hydroksamowego - belinostatu (Bel), na komórki glejaka wielopostaciowego mózgu (*glioblastoma multiforme*, GBM). Najbardziej złośliwego nowotworu ośrodkowego układu nerwowego o zróżnicowanym układzie histologicznym i komórkowym. Co roku w Polsce notuje się ok. 2600 nowych przypadków zachorowań na guzy mózgu, w tym ok. 1200 przypadków na glejaki złośliwe. W ostatnich latach obserwuje się tendencję wzrostową zachorowalności i pomimo postępu neurochirurgii, radio- i chemioterapii prognozowanie wciąż jest pesymistyczne, wskaźnik średniego przeżycia wynosi 12,1-14,6 miesięcy.

Badania Pani mgr Magdaleny Kusaczuk dotyczą zatem bardzo aktualnego problemu i dobrze wpisują się w światowe trendy naukowe poszukiwania skutecznych strategii leczenia glejaka wielopostaciowego mózgu. Szczególne zainteresowanie w tym aspekcie wzbudzają inhibitory deacetylaz histonów, związki indukujące wzmożoną acetylację histonów. Modulują one strukturę chromatyny, co prowadzi do zmian w ekspresji dużej liczby genów mających wpływ na szlaki sygnałowe, są odpowiedzialne za hamowanie przebiegu cyklu komórkowego oraz angiogenezy, a także indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych. Jednak, po obiecujących wynikach badań na zwierzętach oraz badań klinicznych, wiele pytań pozostaje nadal bez odpowiedzi. Mechanizm ich aktywności przeciwnowotworowej nie został dotąd w pełni poznany, jak również działania niepożądane, nie została wyjaśniona selektywność i swoistość działania na poszczególne typy nowotworów. Jak wykazano inhibitory deacetylaz histonów charakteryzują się stosunkowo małą toksycznością, ale reaktywacja epigenetycznie wyciszonych genów pod ich wpływem może stanowić ryzyko potencjalnego unieśmiertelnienia prawidłowych dotąd komórek i rozwoju nowego ogniska pierwotnego nowotworu o innym umiejscowieniu.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje oraz obiecujące dotychczasowe wyniki obserwacji uważam podjęcie przez Doktorantkę niniejszego tematu badawczego za

niezwykle ważne z punktu widzenia nauk farmaceutycznych i medycznych oraz w pełni uzasadnione.

Ocena strony formalnej rozprawy

Praca doktorska Pani mgr Magdaleny Kusaczuk stanowi spójny tematycznie zbiór trzech prac pełnotekstowych, w tym jednej pogładowej i dwóch oryginalnych, eksperymentalnych, zamieszczonych na łamach prestiżowych, o międzynarodowym zasięgu czasopism, takich jak: *Current Pharmaceutical Design*, *Tumor Biology*, *Investigational New Drug*. Znajdują się one na tzw. Liście filadelfijskiej. Ich łączny współczynnik oddziaływania (*Impact Factor*, IF) to 9,259, punktacja MNiSW wynosi 95. Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich pracach.

Układ ocenianej rozprawy jest przedstawiony w sposób czytelny z zachowaniem logicznego porządku tematycznego. Zbiór omawianych publikacji opatrzony jest opracowaniem, na które składają się: *Wprowadzenie* – zapoznające czytelnika w sposób kompetentny z zagadnieniami dotyczącymi znaczenia procesu acetylacji histonów w patogenezie nowotworów, miejscem inhibitorów deacetylaz histonów, zwłaszcza kwasu 4-fenylomasłowego i belinostatu, w leczeniu chorób nowotworowych, z uwzględnieniem metod prowadzonych obserwacji, jak również wyjaśnieniem podstawowych pojęć związanych z tematyką dysertacji; *Cel pracy* – przekonująco uzasadniający wybór podjętych zadań badawczych; *Rozdziały 3, 4 i 5* – obejmujące odpowiednio pracę pogładową pt. „Phenylbutyric acid: simple structure – multiple effects”, opublikowaną w *Current Pharmaceutical Design* w 2015 r., w której w sposób wielokierunkowy, na podstawie 175 pozycji piśmiennictwa (Doktorantka jest współautorem pozycji 107), omówiono właściwości, działanie, znaczenie w terapii kwasu 4-fenylomasłowego; oraz dwie prace oryginalne - pierwsza pt. „Phenylbutyrate – a pan-HDAC inhibitor – suppresses proliferation of glioblastoma LN-229 cell line”, opublikowana w *Tumor Biology* w 2016 r., przedstawiająca obserwacje wpływu PBA na komórki glejaka mózgu linii LN-229 i LN-18 oraz druga pt. „Molecular and cellular effects of a novel hydroxamate-based HDAC inhibitor-belinostat-in glioblastoma cell lines: a preliminary report”, która ukazała się w *Investigational New Drug* w 2016 r., podobnie jak poprzednia publikacja prezentująca unikatowe wyniki dotyczące działania innego modulatora epigenetycznego – belinostatu na wymienione linie komórkowe; *Dyskusja* – interpretująca uzyskane spostrzeżenia w zestawieniu ze znanymi z piśmiennictwa faktami, potwierdzająca zasadność wybranego

celu pracy oraz wskazująca na potencjalne znaczenie aplikacyjne uzyskanych wyników; *Wnioski* - dostarczające cennych informacji i wskazówek do prowadzenia dalszych badań; *Bibliografia* – 33 specjalistyczne pozycje, pochodzące w znacznej mierze z okresu ostatnich 11 lat, odpowiednio dobrane do tematu rozprawy doktorskiej oraz dokładnie opracowane; *Streszczenie w języku polskim i angielskim, Suplement* - obejmujący *Listę publikacji* stanowiących rozprawę doktorską, innych – do których należy praca angielskojęzyczna zamieszczona w czasopiśmie *Current Pharmaceutical Design* o współczynniku oddziaływania (IF) 3,288 i 35 pkt MNiSW, ponadto 9 doniesień zjazdowych, prezentowanych na zjazdach o zasięgu krajowym i międzynarodowym; *Curriculum vitae* – świadczące o dużej aktywności i znaczących kwalifikacjach naukowych Doktorantki, kierowaniu przez nią projektem naukowym finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki w ramach 9 edycji konkursu Preludium oraz czterema projektami statutowymi UMB, a także o uznaniu, jakim darzy środowisko naukowe Panią mgr Magdalenę Kusaciuk, powierzając jej recenzowanie publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym; *Oświadczenia współautorów* - określające ich indywidualny wkład oraz podające odsetek indywidualnego udziału Doktorantki w powstanie poszczególnych prac (70-75%).

Szkoda, że Autorka, zgodnie z układem typowym dla prac oryginalnych, nie umieściła wykazu zastosowanych skrótów z ich rozwinięciem, a także rozdziałów *Material i metody* oraz *Wyniki* - zawierającego zwięzłe zestawienie opisanych w publikacjach efektów badań. Wymieniona uwaga w niczym nie umniejsza walorów merytorycznych pracy.

Ocena merytoryczna

Przedmiotem prac, składających się na cykl stanowiący dysertację doktorską, były badania, które dotyczyły poszukiwania czynników odpowiedzialnych za hamowanie proliferacji i indukcję apoptozy oraz mechanizmów regulacji wymienionych procesów, w komórkach glejaka wielopostaciowego mózgu. Cel ten zrealizowała Doktorantka poprzez analizę wybranych komórkowych i molekularnych efektów działania kwasu 4-fenylomasłowego i belinostatu na komórki glejaka mózgu linii LN-229 i LN-18, jak również ocenę potencjalnych możliwości wykorzystania wymienionych inhibitorów deacetylaz histonów w terapii nowotworów mózgu.

Pani mgr Magdalena Kusaczuk wykazała, że substancje o charakterze modulatorów epigenetycznych, zarówno PBA, jak i Bel skutecznie hamują aktywność enzymatyczną deacetylaz histonów w komórkach glejaka mózgu, przy czym Bel hamuje proliferację obu obserwowanych linii glejaka, a PBA obniża przeżywalność komórek linii LN-229, nie wykazując właściwości cytotoksycznych wobec linii LN-18. Doktorantka stwierdziła pod wpływem PBA silne hamowanie cyklu komórkowego w fazie S i G2/M komórek linii LN-229, z jednoczesnym nasileniem ekspresji genu *p21* i obniżeniem ekspresji genów białek antyapoptotycznych *Bcl-2* i *Bcl-X_L*. Ponadto, belinostat w wyraźny sposób zwiększał ekspresję genów białek proapoptotycznych Puma, Bim i Chip, a zmniejszał białek cytoprotekcyjnych GRP78 i GRP94, indukując proces apoptozy.

Przeprowadzone badania, dobrze zaplanowane przez Doktorantkę pod opieką doświadczonego Promotora, pozwoliły na zrealizowanie założonego celu pracy. Oceniam pozytywnie zakres prac badawczych ze względu na ich charakter nie tylko poznawczy, ale również praktyczny. Wyrazem ich nowatorskiego charakteru i naukowej wartości było ich opublikowanie w renomowanych czasopismach, a zatem i recenzowanie przez międzynarodowy zespół ekspercki. Znacząco podnosi to ich ocenę merytoryczną. Także metody badawcze opisane szczegółowo w publikacjach nie budzą zastrzeżeń. Pani mgr M. Kusaczuk wykonała serię pracochłonnych obserwacji, które wymagały nie tylko wiedzy teoretycznej, ale także umiejętności manualnych posługiwania się nowoczesnymi, precyzyjnymi metodami wyznaczającymi postęp w dziedzinie biologii molekularnej i biochemii.

Wyniki badań zakończone słusznymi nowatorskimi wnioskami, świadczącymi o innowacyjnym charakterze obserwacji, kompetencjach Kandydatki oraz umiejętności rozwiązywania trudnych problemów badawczych, dostarczają cennych informacji i wskazówek do prowadzenia dalszych badań, które mogą przyczynić się do optymalizacji leczenia glejaków mózgu.

Podsumowanie

Stwierdzam, że wyniki pracy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Kusaczuk mają duże znaczenie poznawcze i praktyczne wzbogacające wiedzę z zakresu biologii molekularnej, biochemii, genetyki nowotworów. Sposób przeprowadzonych obserwacji, rzeczowa dyskusja i przedstawione wyniki świadczą o dojrzałości naukowej Doktorantki oraz możliwościach samodzielnego prowadzenia badań. Praca odpowiada w pełni wymogom stawianym wobec rozpraw doktorskich.

Zwracam się zatem z pełnym przekonaniem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, proponuję wyróżnienie pracy doktorskiej, biorąc pod uwagę spełnienie warunków Regulaminu wyróżniania rozpraw doktorskich na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku obejmujących: wysoki poziom pracy, elementy nowości naukowej zawarte w ocenianej rozprawie, zastosowanie złożonego warsztatu metodycznego, potencjalne znaczenie praktyczne opisanych badań. Ponadto sumaryczny współczynnik wpływu publikacji wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej jest większy od 4 (wynosi 9,259), Kandydatka jest pierwszym współautorem trzech publikacji zamieszczonych w czasopismach z listy JCR posiadających sumaryczny IF większy niż 5 oraz pierwszym autorem dwóch publikacji nie mających charakteru pracy przeglądowej opublikowanych w czasopismach o współczynniku wpływu powyżej 5.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
FARMAKOLOGII KLINICZNEJ
kierownik
prof. dr hab. Anna Wiśła-Hojeńska

Wrocław, 28.12.2016 r.