

Łódź, 2016-11-21

Prof. dr hab. n. farm. Wojciech Mielicki
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Międzywydziałowa Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej
Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej

Ocena rozprawy doktorskiej

pt.: „Zastosowanie wybranych inhibitorów deacetylaz histonów jako farmakologicznych modulatorów epigenetycznych w badaniach na komórkach glejaka wielopostaciowego mózgu”

wykonanej przez mgr Magdalenę Kusaczuk w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Glejak wielopostaciowy mózgu jest głęboko naciekającym nowotworem złośliwym, drugim po białaczkach co do częstości występowania u dzieci. Rokowania zależą od stopnia złośliwości guza, najczęściej jednak rok od zdiagnozowania przeżywa jedynie połowa pacjentów. Leczenie jest trudne, jeżeli jest to możliwe ze względu na lokalizację w pierwszej kolejności stosuje się radykalny zabieg chirurgiczny, a jeżeli nie można usunąć całości guza, lub pooperacyjnie wprowadza się radio- i chemioterapię, czy leczenie immunologiczne (bewacyzumab).

Jak wszystkie nowotwory złośliwe glejak wielopostaciowy powstaje w wyniku rozchwiania genomu w skutek nagromadzenia wielu mutacji protoonkogenów, antyonkogenów i genów supresorowych. Oprócz uszkodzeń genomu wynikających z mutacji, istotną rolę w modulacji ekspresji genów pełnią zmiany epigenetyczne, czyli zachodzące bez zmian sekwencji genomu. Związane są ze zmianami struktury chromatyny, czyli zarówno z modyfikacjami potranslacyjnymi białek histonowych, jak i przebudową DNA (np. metylacją zasad azotowych), co wpływać może na szybkość i natężenie ekspresji genów. Obecnie coraz więcej badań prowadzonych jest nad wyjaśnieniem mechanizmów zjawisk epigenetycznych i powiązaniem ich z transformacją nowotworową.

Histony są białkami tworzącymi rdzeń, wokół którego „owinięta” jest podwójna nić DNA. Modyfikacje potranslacyjne białek histonowych i związana z tym przebudowa chromatyny, może mieć wpływ na ekspresję genów zaangażowanych w przebieg i regulację cyklu komórkowego, a więc bezpośrednio związanych z kancerogenezą. Jednym z rodzajów zmian epigenetycznych, odgrywających istotną rolę w regulacji transkrypcji genów, jest acetylacja i deacetylacja histonów, katalizowana przez acetylotransferazy histonów i deacetylazy histonów. Hiperacetylacja histonów prowadzi do nasilenia ekspresji genów,

podczas gdy deacetylacja obniża ich ekspresję. Stwierdzono, że w komórkach wielu nowotworów dochodzi do przesunięcia równowagi dynamicznej między acetylacją i deacetylacją na stronę deacetylacji, co wiąże się z obniżeniem stopnia acetylacji histonów i związanym z tym wyciszeniem wielu genów, w tym supresorów. Proces ten może mieć wpływ na wzrost i proliferację komórek nowotworowych. W komórkach glejaka wielopostaciowego mózgu opisano nadekspresję genów kodujących deacetylazy, a co za tym idzie zwiększoną aktywność tych enzymów, podczas, gdy potencjał deacylacyjny w komórkach prawidłowego astrogleju był niski.

Badania prowadzone przez mgr Magdalenę Kusaczuk dotyczą wpływu inhibitorów deacetylaz: kwasu 4-fenylomasłowego oraz belinostatu, będącego pochodną kwasu hydroksamowego, na proliferację komórek glejaka wielopostaciowego linii LN-18 i LN-229 hodowanych *in vitro*. W świetle informacji podanych wyżej, podjęcie przez Doktorantkę próby hamowania proliferacji komórek tego nowotworu poprzez modulację zmian epigenetycznych oraz analiza molekularnych mechanizmów działania badanych inhibitorów jest jak najbardziej uzasadnione. Wiadomo, że kwas 4-fenylomasłowy hamuje proliferację komórek glejaka wielopostaciowego, jednak innych linii komórkowych, niż badanych przez Doktorantkę. Działanie belinostatu na proliferację komórek glejaka nie było jeszcze analizowane. Zarówno wybór tematu badań, jak i modelu doświadczalnego jest więc właściwy. Eksperymenty prowadzone przez mgr Magdalenę Kusaczuk są nowatorskie i poszerzają stan wiedzy na temat molekularnych mechanizmów wzrostu glejaka wielopostaciowego. Co jest bardzo istotne, mogą stanowić pierwszy krok w kierunku opracowania nowej strategii terapii tego nowotworu.

Celem postawionym sobie przez Doktorantkę była analiza komórkowych i molekularnych efektów działania kwasu 4-fenylomasłowego i belinostatu na komórki glejaka wielopostaciowego linii LN-18 i LN-229, a także ocena potencjalnych możliwości wykorzystania badanych inhibitorów deacetylaz w terapii tego nowotworu. Cel sformułowany został jasno i precyzyjnie, wynikał z przeglądu danych piśmiennictwa.

Rozprawę przygotowaną przez Doktorantkę rozpoczyna wprowadzenie, w którym w sposób właściwy uzasadniono celowość podjętych badań, a następnie w sposób jednoznaczny przedstawiono cel pracy. Szeroką analizę komórkowych oraz molekularnych mechanizmów działania kwasu 4-fenylomasłowego w różnych stanach patologicznych, w tym w chorobie nowotworowej, przedstawiono w artykule poglądowym, którego Doktorantka jest pierwszym autorem. Kolejną część rozprawy stanowią dwie prace eksperymentalne, których mgr Magdalena Kusaczuk jest również pierwszym autorem, dotyczące działania kwasu 4-fenylomasłowego oraz belinostatu na hodowane komórki glejaka wielopostaciowego linii LN-18 i LN-229.

Jako, że wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę doświadczeń opublikowane zostały w recenzowanych czasopismach fachowych o zasięgu międzynarodowych, nie na miejscu będzie merytoryczna ocena tych prac. Została ona już dokonana przez recenzentów wyznaczonych przez odpowiednie redakcje. Mogę jedynie stwierdzić, że Doktorantka w sposób logiczny i przemyślany przedstawiła założenia oraz materiały i metody wykorzystywane w swoich badaniach, wyniki przedstawione są w sposób czytelny i jednoznaczny, a dyskusja napisana jest w sposób umiemy i wskazujący na dojrzałość naukową Autorki.

Mgr Magdalena Kusaczuk wykazała, że obydwa analizowane inhibitory deacetylaz histonów hamują aktywność tych enzymów w komórkach glejaka wielopostaciowego linii LN-18 oraz LN-229. Stwierdziła, że kwas 4-fenylomastłowy obniża przeżywalność komórek linii LN-229, nie wykazując cytotoksyczności w stosunku do komórek linii LN-18. Mechanizm hamowania proliferacji komórek LN-229 polega na hamowaniu cyklu komórkowego w fazie S i G2/M, czemu towarzyszy obniżenie ekspresji genów kodujących białka antyapoptotyczne z rodziny Bcl. Belinostat hamował proliferację obydwu badanych linii komórek glejaka, kierując je na szlak apoptozy. Uzyskane wyniki wskazują na potencjalną możliwość wykorzystania belinostatu w opracowaniu nowych strategii terapii glejaka wielopostaciowego mózgu.

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Kusaczuk zawiera streszczenie wyników badań, podane w języku polskim i angielskim, w którym w sposób syntetyczny przedstawiono najważniejsze założenia, wyniki i wnioski płynące z pracy. Rozprawę kończy wykaz publikacji, których Doktorantka jest współautorką oraz oświadczenia współautorów tych publikacji o swoim udziale w projektowaniu i prowadzeniu eksperymentów, a także w przygotowaniu wyników do druku.

Recenzent nie byłby recenzentem, gdyby się do czegoś nie przyczepił. We wprowadzeniu, uzasadniając celowość podjęcia projektowanych badań Doktorantka nie ustrzegła się kilku drobnych błędów. Np. na str. 4, wiersz 7, pisze: „... w komórkach ... dochodzi do akumulacji wielu zaburzeń genetycznych takich, jak np. amplifikacja receptora nabłonkowego czynnika wzrostu...”, zamiast: „amplifikacja genu receptora nabłonkowego czynnika wzrostu...”.

Na tej samej stronie, ostatni wiersz, pisze: „... acetylacja fragmentów białek histonowych odgrywa istotną rolę w regulacji transkrypcji komórek eukariotycznych...”, zamiast: „... w regulacji transkrypcji genów komórek eukariotycznych...”. W wielu miejscach używany jest termin „modyfikacje posttranslacyjne”, podczas, gdy zalecaną formą jest „modyfikacje potranslacyjne”. W artykule opublikowanym w *Tumor Biology* wklejono najpierw stronę 936, a później 935. W artykule opublikowanym w *Current Pharmaceutical Design* na rycinie 2 (str. 2149) redakcja nie zauważyła błędnie podanej nazwy: „carbamylphosphate” zamiast „carbamoyl phosphate”. Są to jednak drobiazgi, w niczym nie wpływające na wartość ocenianej pracy, a zasygnalizowane zostały jedynie po to, aby udowodnić, że recenzent przeczytał całą rozprawę.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr Magdaleny Kusaczuk oceniam wysoko. Stanowi ona niewątpliwie samodzielne rozwiązanie konkretnego problemu badawczego, postawionego przez Doktorantkę jako cel badań. Cel ten został zrealizowany w całości, a drobne uwagi recenzenta w niczym nie umniejszają rangi pracy. Praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, opisane w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. Należy podkreślić, że wyniki badań Doktorantki opublikowane zostały w międzynarodowych czasopismach specjalistycznych z listy filadelfijskiej, a w pracach tych Doktorantka jest pierwszym autorem. Przedstawiam zatem Pani Dziekan oraz Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o przyjęcie pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr Magdaleny Kusaczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę fakt, że oceniana praca prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy, ma istotne walory poznawcze, a być może i aplikacyjne, oraz ze względu na to, że rozprawa składa się z trzech prac o łącznym wskaźniku wpływu IF ponad 9 (punktacja MNiSW wynosi 95), w pracach tych Doktorantka była pierwszym autorem, a według oświadczeń współautorów Jej udział w wykonaniu i publikacji tych prac wynosił ponad 70%, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału o wyróżnienie pracy.

