

Akceptuję
MOM

OCENA ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH
LEKARZA KAROLINY JANYST PT.:
„BADANIE EFEKTYWNOŚCI DZIAŁANIA NOWYCH KOMBINACJI LEKÓW
PRZECIWNOWOTWOROWYCH I POTENCJALNYCH TERAPEUTYKÓW NA
KOMÓRKI RAKA JAJNIKA CZŁOWIEKA W MODELU *IN VITRO*”.

Nowotwory złośliwe jajnika stanowią istotny z epidemiologicznego punktu widzenia problem zdrowotny. Nowotwór ten, stanowiący bez wątpienia największe wyzwanie w ginekologii onkologicznej, najczęściej jest rozpoznawany w zaawansowanym stadium, czyli stopniu III i IV wg Klasyfikacji FIGO. Jak wynika ze statystyk, mimo utrzymującego się trendu coraz większej liczby zachorowań wśród kobiet na ten nowotwór, liczba zgonów z tego powodu od lat pozostaje na względnie stałym poziomie. Stan ten jest wynikiem z jednej strony coraz bardziej precyzyjnych technik stosowanych w chirurgii cytoredukcyjnej, z drugiej – coraz większym postępem w terapii systemowej. Przekłada się to na coraz większe szanse na wydłużenie życia oraz przeżycia całkowite. To ostatnie, czyli postęp w zakresie farmakoterapii, nie byłoby możliwe, gdyby nie coraz lepsze zrozumienie biologii raka jajnika. Dekady rozwoju konwencjonalnej chemioterapii pokazały, że jej możliwości są jednak znacznie ograniczone przez istotną cytotoksyczność zależną od dawki oraz narastającą lekooporność wraz z długością jej stosowania. Jednak ostatnie badania wskazujące na rolę zmian epigenetycznych w patofizjologii raka jajnika (ale też innych nowotworów złośliwych), a tym samym rolę metylacji DNA i modyfikacji histonów w kontekście możliwego wykorzystania w leczeniu, otworzyły drogę do eksploracji nowych, potencjalnie skutecznych substancji mogących mieć znaczenie w terapii pacjentów z chorobą nowotworową.

Jedną z takich grup substancji są inhibitory deacetylazy histonowej (HDAC), których wpływ na komórki raka jajnika stał się przedmiotem zainteresowań badawczych Doktorantki przedstawionych w niniejszej dysertacji.

Celem pracy były poszukiwania nowych wariantów chemioterapii w celu poprawy efektywności leczenia raka jajnika. Chcąc zrealizować ten nadrzędny cel, Doktorantka postawiła sobie kilka celów szczegółowych, w każdym starając się

wykazać znaczenie skryptaidu, czyli inhibitora deacetylazy histonowej (HDAC) zarówno w kombinacji z klasycznymi czynnikami chemioterapeutycznymi, jak: paklitaksel, karboplatyna, doksorubicyna czy etopozyd, jak i bortezomibem, czyli wybiórczym, odwracalnym inhibitorem proteasomu, który dotychczas jest wykorzystywany i zarejestrowany do leczenia szpiczaka plazmocytoowego oraz chłoniaka z komórek płaszczka, w odniesieniu do komórek raka jajnika. Ponadto, celem pracy była próba określenia mechanizmów zakładanego synergistycznego działania kombinacji wyżej wymienionych substancji na linie komórkowe raka jajnika.

Całość pracy obejmuje 110 stron w klasycznym układzie dla dysertacji naukowych i zawiera **Wstęp, Cel pracy, Metodykę, Materiał, Wyniki, ich Dyskusję, Wnioski, Piśmiennictwo**. Umieszczenie na początku pracy wykazu skrótów oraz streszczenia (również w języku angielskim) jest pomocne i ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z treścią pracy.

Wstęp pracy jest zwięzły, zawiera ogólny opis i charakterystykę inhibitorów deacetylaz histonowych, w tym ich przedstawiciela, który został poddany analizie, czyli skryptaidu, oraz inhibitorów proteasomów, w tym bortezomibu, związku, którego działanie i wpływ na komórki raka jajnika również poddano w tej pracy analizie. We wstępie znalazł się także krótki opis problemu klinicznego, jakim jest rak jajnika w odniesieniu do danych epidemiologicznych krajowych i globalnych oraz aktualne sposoby farmakoterapii tego nowotworu, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmu działania antybiotyku antracyklinowego, czyli – w tym przypadku – doksorubicyny. Dzięki takiemu podejściu czytelnik uzyskuje niezbędne podstawy do dalszego zrozumienia pracy, bez wrażenia, często spotykanego w dysertacjach mniej doświadczonych badaczy, nadmiaru przekazywanych informacji.

W rozdziale **Materiały i Metody** określono, że badania nad efektywnością poddanych analizie substancji wykonano na liniach komórkowych raka jajnika, komercyjnie dostępnych, czyli: SKOV-3, OVP-10, MDAH-2774, oraz pierwotnych linii komórkowych raka jajnika uzyskanych w wyniku operacji przeprowadzonych u 15 chorych leczonych operacyjnie na Oddziale Ginekologii Onkologicznej II Katedry i Kliniki Położnictwa i Ginekologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w okresie od maja 2020 roku do sierpnia 2021 roku. Do badania zaklasyfikowano chore z rakiem

jajnika w III i IV stopniu zaawansowania choroby wg FIGO. Materiał pobrany do badań i analizy w tym ostatnim przypadku pochodził z otrzewnowego płynu przesiękowego. Analiza danych pochodzących od tych chorych miała charakter prospektywny; na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej. Wyselekcjonowano następujące substancje do badania: doksorubicyna, etopozyd, paklitaksel, karboplatyna, bortezomib i skryptaid. Do oceny cytotoksyczności badanych związków wobec komórek nowotworowych wykorzystano test MTT oraz test Almar Blue. Ocena apoptozy komórek nowotworowych pod wpływem badanych substancji lub ich kombinacji oceniona została przy pomocy cytometrii przepływowej.

W rozdziale tym Doktorantka bardzo szczegółowo opisuje warsztat zarówno oceny immunohistochemicznej, jak i molekularnej z podaniem bardzo dokładnie etapów i warunków procesu oczyszczania pierwotnych linii komórkowych z zanieczyszczeń, takich jak elementy morfotyczne czy fibroblasty. Jakkolwiek trudno mi osobiście odnieść się do zastosowanych metod laboratoryjnych, to takie podejście odzwierciedla doświadczenie laboratoryjne Autorki pracy oraz daje czytelnikowi poczucie bardzo starannego jej osobistego przygotowania do przeprowadzenia zaplanowanych przez nią, przedstawionych badań. Rozdział ***Materiały i Metody*** kończy się zwięzłym i przemyślanym opisem zastosowanych metod statystycznych do oceny wyników pracy. Należy podkreślić, że dobór metodyki analizy matematycznej uzyskanych wyników jest trafny.

Efekty swoich badań Doktorantka przedstawiła w formie opisowej w rozdziale ***Wyniki***, który został podzielony na 3 zasadnicze części:

- Ocena izolowanego działania wyselekcjonowanych substancji (wymienionych w poprzednim rozdziale) na komórki raka jajnika linii SKOV-3, MDAH-2774 oraz OVP-10.
- Ocena działania kombinacji skryptaidu i pozostałych wyselekcjonowanych substancji na komórki raka jajnika linii SKOV-3, MDAH-2774 oraz OVP-10.
- Ocena działania synergistycznych kombinacji związków (leków) na komórki raka jajnika linii pierwotnych OVCA-1,3,4,5,7,9,10,12,13,15 (materiał pochodzący od pozostałych 5 pacjentek został odrzucony w wyniku selekcji w trakcie jego przygotowywania).

Należy podkreślić, że rozdział ten posiada staranne opracowanie graficzne w postaci 62 rycin, 7 zdjęć morfologicznych oraz 2 tabel. Wyniki badań przedstawione są w bardzo starannej i czytelnej formie, co znacznie ułatwia ich analizę.

Obszerne omówienie uzyskanych i przedstawionych wyników znajduje się w rozdziale *Dyskusja*. Ta część dysertacji zawiera również porównania uzyskanych przez Doktorantkę wyników z doniesieniami innych badaczy. Najważniejszą konkluzją wynikającą z badań Doktorantki jest wyodrębnienie kombinacji skryptaidu z tradycyjnymi substancjami stosowanymi w leczeniu kobiet z rakiem jajnika o największym potencjale cytotoksycznym. Należą do nich kombinacja skryptaidu z bortezomibem oraz z doksorubicyną. Kombinacje tych związków wykazały działanie synergistyczne zarówno w liniach komórkowych komercyjnych, jak i w przypadku większości linii komórkowych pierwotnych. Co więcej, to silne działanie synergistyczne pozwoliło na uzyskanie pożądanego efektu już przy suboptymalnych stężeniach tych substancji, co potencjalnie w praktyce klinicznej może przełożyć się na mniejszą ilość działań niepożądanych tych leków. W swojej pracy badawczej Doktorantka nie ograniczyła się jedynie do wykazania ww. zależności, ale zdecydowała się podjąć próbę wyjaśnienia mechanizmu, na podstawie którego te synergistyczne zjawiska następują. Dokonała tego przez analizę poziomu apoptozy komórek nowotworowych poddanych działaniu wspomnianych związków, z wykorzystaniem oceny ekspresji kaspazy 9 oraz pociętej formy białka PARP, które to enzymy i produkty blokują cykl komórkowy w fazie G1, co przejawia się zwiększoną ekspresją białka p21. Takie podejście do pracy badawczej Doktorantki świadczy o jej ciekawości i dociekliwości jako badacza oraz podkreśla, bez wątpienia, innowacyjny charakter przeprowadzonych badań.

Dysertację kończy prezentacja 6 *Wniosków*, które wynikają bezpośrednio z przeprowadzonych badań i odnoszą się dokładnie do założonych szczegółowych celów rozprawy. Autorce udało się wykazać synergizm działania cytotoksycznego na linie komórek raka jajnika skryptaidu i doksorubicyny oraz skryptaidu i bortezomibu (i to w dawkach suboptymalnych). Wykazała ona również, że działanie to zostało osiągnięte przez wzrost efektu apoptotycznego w komórkach nowotworowych, a mechanizm, który prawdopodobnie uczestniczy w tym procesie oparty jest o blokowanie lizosomalnej drogi niszczenia białek w komórce przez zahamowanie deacetylazy histonowej 6 i w efekcie doprowadzając do przerwania szlaku tworzenia

agresomów. Tego rodzaju wnioski mogą mieć w przyszłości bezpośrednie przełożenie na podejmowanie terapeutycznych decyzji wobec chorych z rakiem jajnika, zwłaszcza tych zmagających się z postacią tej choroby oraz jej nawrotem opornymi na leczenie tradycyjnymi substancjami.

Piśmiennictwo wykorzystane w pracy zawiera 142 pozycje, w większości (137) autorów zagranicznych, co świadczy o niewielkiej jak do tej pory liczbie przeprowadzonych badań w naszym kraju w tym temacie. Powinno to stanowić zachętę dla Autorki dysertacji do kontynuowania dalszych badań nad tym zagadnieniem. Rozprawa uzupełniona jest o 2-stronicowe **Streszczenie** w języku polskim i angielskim, w którym Doktorantka dokonuje zwięzłego omówienia założeń, celów, wyników i wniosków swojej pracy.

W zasadzie praca pozbawiona jest słabych stron, stąd nie mam uwag krytycznych. Chciałbym natomiast podkreślić niezwykle dojrzały i staranny warsztat naukowy Doktorantki, jak i cenny wybór samego celu przeprowadzonych badań. Wnioski, jakie wynikają z niniejszej rozprawy, mają szansę na bezpośrednie przełożenie na praktykę, a co się z tym wiąże, dają szansę na poprawę wyników leczenia w najtrudniejszych sytuacjach klinicznych tej, i tak już niezwykle trudnej do leczenia, choroby.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja dotyczy nowatorskiego problemu badawczego, zawiera jasno postawiony cel pracy, demonstruje nowoczesny i profesjonalny warsztat badawczy oraz prawidłowo przedstawia wyniki i wnioski z nich płynące. Wnioski te mają szansę bezpośrednio wpływać na praktykę kliniczną. Stąd uważam, że rozprawa lekarza Karoliny Janyst pt.: „Badanie efektywności działania nowych kombinacji leków przeciwnowotworowych i potencjalnych terapeutyków na komórki raka jajnika człowieka w modelu *in vitro*” spełnia wszelkie wymogi stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. Z 2007 r., poz. 1789). W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lekarza Karoliny Janyst do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie innowacyjny charakter badania, potencjalna możliwość wykorzystania jego wyników w praktyce klinicznej oraz bardzo staranne opracowanie dzieła przez Doktorantkę skłania mnie do postawienia wniosku o wyróżnienie tej pracy.

A handwritten signature in black ink, reading "Paweł Basta". The signature is written in a cursive style with a large initial 'P' and a stylized 'B'.

Kraków, dn. 30.08.2023 r.

dr hab. n. med. Paweł Basta