

Warszawa, 31.07.2019 r.

Dr hab. Kamil Brzoska, prof. IChTJ  
Zakład Naukowy – Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej  
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej  
ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa  
tel. 22 504 1174  
e-mail: k.brzoska@ichtj.waw.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Damiana Krzyżanowskiego pt. „Ekspresja transporterów oporności wielolekowej jako czynnik modulujący wrażliwość komórek na stres oksydacyjny”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Damiana Krzyżanowskiego została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Bartosza oraz opieką promotora pomocniczego dr Agnieszki Grzelak w Katedrze Biofizyki Molekularnej Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego. Badania były prowadzone przy wsparciu finansowym pochodzącym z Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka oraz Narodowego Centrum Nauki.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy zjawiska oporności wielolekowej komórek nowotworowych, związanej z nadekspresją białek z rodziny ABC oraz fenomenu wrażliwości tych komórek na stres oksydacyjny. Mimo rozwoju technik diagnostycznych i terapeutycznych nowotwory złośliwe wciąż stanowią znaczący problem medyczny, ekonomiczny i społeczny. Jednym z problemów napotykanym w trakcie chemioterapii jest pierwotna lub nabyta oporność komórek nowotworowych na stosowane leki antynowotworowe. Jest ona często związana ze zwiększoną ekspresją i/lub aktywnością białek z rodziny ABC. Są to transportery błonowe o szerokim spektrum substratów obejmującym związki istotne z klinicznego punktu widzenia, takie jak leki przeciwnowotworowe. Paradoksalnie, oporności na chemoterapeutyki wywołanej przez zwiększoną ekspresję białek ABC, może towarzyszyć wzrost wrażliwości na inne czynniki np. stres oksydacyjny. Zjawisko to określa się mianem wrażliwości pobocznej. Celem recenzowanej pracy było zweryfikowanie hipotezy mówiącej, że nadekspresja kluczowych z klinicznego punktu widzenia białek ABCB1 i ABCG2 skutkuje wzrostem wrażliwości komórek nowotworowych na czynniki wywołujące stres oksydacyjny oraz charakterystyka mechanizmów leżących u podstaw

tego zjawiska. Co ciekawe, oprócz klasycznych związków wywołujących stres oksydacyjny takich jak  $H_2O_2$ , wodoronadtlenek tert-butylu czy parakwat, Doktorant w swoich badaniach zastosował również mniej oczywisty czynnik wywołujący stres oksydacyjny, a mianowicie nanocząstki srebra. Nanocząstki to obiekty, których wszystkie wymiary są mniejszy niż 100 nm. Z uwagi na duży stosunek powierzchni do objętości często posiadają one interesujące właściwości, znacząco różne od właściwości większych cząstek zbudowanych z tego samego materiału. Wraz z rozwojem metod syntezy nanocząstek o przeróżnym składzie i właściwościach fizykochemicznych, rośnie również ich wykorzystanie w różnych gałęziach przemysłu i medycyny co skutkuje wzrastającą ekspozycją ludzi na nanocząstki. Ekspozycja ta może być celowa, np. w przypadku zastosowań nanocząstek jako nośników leków lub czynników kontrastowych w diagnostyce medycznej, lub niezamierzona np. poprzez zanieczyszczenie środowiska nanocząstkami pochodzącymi z zastosowań przemysłowych. Jedną z barier w rozwoju nowych zastosowań nanocząstek, jest niewystarczająca znajomość ich oddziaływań z układami biologicznymi, oraz ich potencjalna toksyczność. Nanocząstki srebra są obecnie najczęściej wykorzystywanym rodzajem nanomateriałów, głównie ze względu na ich właściwości antybakteryjne. Z tego powodu poznanie mechanizmów oddziaływania nanocząstek srebra z układami biologicznymi jest sprawą niezmiernie ważną. Wobec powyższego, wybór przez Doktoranta opisanej powyżej tematyki badań uważam za bardzo interesujący, nowatorski i w pełni uzasadniony.

Przedstawiona do oceny rozprawa przygotowana jest w sposób klasyczny i składa się ze spisu treści, wykazu skrótów i symboli, wstępu zakończonego wyszczególnieniem celów pracy, rozdziału o materiałach i metodach, wyników i dyskusji zakończonej wnioskami. Na końcu pracy znajduje bibliografia zawierająca 152 pozycje oraz załącznik przedstawiający szczegółowe dane dotyczące wyników analizy ekspresji genów. Dołączone streszczenie w języku polskim i angielskim dobrze oddaje charakter prac i nie budzi zastrzeżeń.

Wstęp zawiera szerokie i dobrze skonstruowane wprowadzenie w tematykę pracy. Począwszy od opisu chorób nowotworowych i problemu oporności wielolekowej, poprzez charakterystykę białek z rodziny ABC, zjawisko oporności pobocznej, rolę reaktywnych form tlenu i stresu oksydacyjnego w procesie nowotworzenia aż do problemu wpływu nanocząstek srebra na organizmy żywe i zagadnienia stresu oksydacyjnego wywołanego przez te nanocząstki. Moje uwagi do tej części pracy są następujące:

- 1) Na str. 8 w pierwszym akapicie nie podano źródła literaturowego z którego pochodzą dane dotyczące statystyki zachorowań na nowotwory w Polsce. Podobnie na str. 15 brak odnośnika do źródła informacji dotyczących modelu transportu o naprzemiennym dostępie. Również dwa pierwsze akapity podrozdziału 1.3.2. nie zawierają żadnych odnośników literaturowych a moim zdaniem powinny. W pierwszym akapicie tego podrozdziału czytamy: „Wiele doniesień wykazuje, że komórki nowotworowe mają podwyższony poziom reaktywnych form tlenu w porównaniu do komórek prawidłowych.” Warto byłoby zamieścić odnośniki do kilku z tych doniesień.
- 2) Doktorant zamiennie używa różnych symboli tego samego białka (np. ABCC1 i MRP1 na str. 12) utrudnia to śledzenie wywodu czytelnikowi nieznającemu dokładnie nomenklatury białek z rodziny ABC, zmuszając do regularnych powrotów na stronę 10 pracy do tabeli 1.1, w której zebrane są wszystkie stosowane nazwy białek ABC.
- 3) Na dole rysunku 1.2 (str. 19) jako produkt reakcji katalizowanej przez katalazę widnieje  $H_2O_2$  zamiast  $H_2O$ .
- 4) Na str. 20-21 doktorant stwierdza, iż „Wykazano, że nadtlenuk wodoru może wywoływać mutację kodonu 249 genu p53 powodując inaktywację ww. białka i w konsekwencji nowotworzenie” i przywołuje pracę Hussaina i wsp. z 1994 r. Stwierdzenie powyższe wydało mi się zastanawiające, gdyż zazwyczaj uważa się, że  $H_2O_2$  jest zbyt mało reaktywny aby bezpośrednio indukować uszkodzenia DNA. Rzeczywiście, w cytowanej pracy komórki traktowano równocześnie  $H_2O_2$  i  $FeCl_3$ , więc obserwowane uszkodzenia DNA były prawdopodobnie wywołane przez powstający w reakcji Fentona rodnik hydroksylowy a nie bezpośrednio przez  $H_2O_2$ .
- 5) Na str. 21 opis wpływu  $H_2O_2$  na szlak PI3K/Akt jest niejasny. Autor zdaje się twierdzić, że inaktywacja fosfatazy PTEN, która jest inhibitorem szlaku kinazy Akt, powoduje zablokowanie tego szlaku. Wydaje mi się, że powinno być odwrotnie czyli inaktywacja inhibitora powinna skutkować aktywacją szlaku.
- 6) Stwierdzenie ze str. 21, iż aktywacja Nfr2 powoduje „ekspresję transkrypcyjną” wydaje mi się niefortunne. Wystarczyłoby napisać, że powoduje wzrost transkrypcji.
- 7) Na str. 23 czytamy o komórkach charakteryzujących się „opornością wielolekową i tym samym nadekspresją glikoproteiny P” co sugeruje, że oporność wielolekowa jest

przyczyną nadekspresji glikoproteiny P a jest przecież dokładnie odwrotnie. Podobne stwierdzenie znajduje się na str. 31 w opisie celów pracy.

- 8) Na str. 24 Doktorant stawia znak równości między terminem nanomateriały a nanocząstki co jest nieuprawnione. Jak słusznie zauważa Doktorant, nanomateriały mają jeden z wymiarów mniejszy od 100 nm. Nanocząstki natomiast, mają wszystkie trzy wymiary mniejsze od 100 nm. Nanocząstki są więc jednym z rodzajów nanomateriałów.
- 9) W podrozdziale 1.5.1. opisującym wpływ nanocząstek srebra na organizm warto byłoby wspomnieć o argyrii czyli srebrzycy.
- 10) Co Doktorant miał na myśli pisząc na str. 27, że „Wnikanie nanocząstek srebra jest procesem ściśle zależnym od (...) niezbędnej energii?”
- 11) Na str. 26 Doktorant stwierdza, że „Transport nanocząstek srebra do wnętrza komórek rozpoczyna się od ich rozpoznania przez receptory błonowe”. Czy rzeczywiście wnikanie nanocząstek srebra do komórki zawsze jest zależne od receptorów błonowych i czy istnieją receptory specyficznym rozpoznające nanocząstki srebra?
- 12) Czy rzeczywiście kinazy PAK, MAPK oraz fosfataza PP2A są receptorami jak stwierdza Doktorant na str. 27 swojej rozprawy?
- 13) Na str. 29 czytamy, że katepsyny „powodują hydrolityczną degradację łańcuchów białkowych zaangażowanych w rozkład komórek i tym samym kierują komórki na drogę apoptozy zależnej od kaspaz.” Jakie łańcuchy białkowe autor ma na myśli?
- 14) Cel drugi pracy jest niefortunnie sformułowany gdyż sugeruje, że wyniki badań będących pierwszym celem pracy są znane *a priori*.

W rozdziale „Materiały i Metody” mgr Krzyżanowski wyczerpująco opisał stosowane przez siebie techniki badawcze, co ułatwiło późniejsze śledzenie otrzymanych wyników. Na podkreślenie zasługuje imponujące spektrum metod, którymi posługiwał się Doktorant. Moje uwagi do tej części pracy są następujące:

- 1) Na str. 45 Doktorant błędnie określa syntezę cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji jako łańcuchową reakcję polimerazy (PCR). Synteza cDNA nie jest reakcją PCR. Dodatkowo, reakcja syntezy cDNA nie przebiega w trzech cyklach ale w trzech etapach, z których żaden się nie powtarza, nie ma tu więc mowy o cykliczności.

- 2) Co zdecydowało o wyborze *HNRNPH1* jako genu referencyjnego przy oznaczaniu ekspresji genów ABC metodą ilościowego PCR? Czy przeprowadzono analizy wskazujące, że w danych warunkach jest on bardziej stabilny niż najczęściej wykorzystywane geny referencyjne takie jak *ACTB*, *GAPDH*, *GUSB*?
- 3) W tabeli 3.3 na str. 47 czas trwania elongacji wynosi 1 s. Podejrzewam, że to pomyłka.

Dokumentacja otrzymanych wyników zajmuje około 40 stron. Wyniki są przedstawione w większości jasno i klarownie z wykorzystaniem licznych tabel i wykresów. Część z wyników została już opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *Free Radical Biology and Medicine*. Moje uwagi do tej części pracy są następujące:

- 1) Jaki był powód wykorzystania różnych metod oznaczania cytotoksyczności dla poszczególnych linii komórkowych? W przypadku linii MDCKII-BCRP stosowano test z wykorzystaniem resazuryiny oraz test z wykorzystaniem czerwieni obojętnej a w przypadku linii MDCKII – MDR tylko test z wykorzystaniem czerwieni obojętnej. Dlaczego na różnych liniach komórkowych testowano różne zestawy związków wywołujących stres oksydacyjny?
- 2) Termin „enzymy stresu oksydacyjnego” użyty w opisie tabeli 4.6 na str. 70 jest niefortunny. Są to enzymy związane z obroną komórki przed stresem oksydacyjnym.
- 3) W podrozdziale 4.3.4. (str. 71-74) przedstawiono wyniki pokazujące, że inhibitory białka ABCG2 nie mają wpływu na cytotoksyczność związków utleniających oraz poziom glutationu w komórkach. Czy stosowano jakąś kontrolę pozytywną w celu sprawdzenia czy stosowane inhibitory mają odpowiednią aktywność?
- 4) W tabelach 4.10 i 4.11 (str. 79-80) zamieszczono wyniki oznaczeń ekspresji genów związanych odpowiednio: z apoptozą i szlakiem NF- $\kappa$ B. Część genów (np. *TNF*, *BCI2*, *FASLG*) jest obecna w obu tabelach jednak wyniki dla tych genów w obu tabelach znacznie różnią się od siebie. Z czego wynikają różnice?
- 5) Czy wszystkie zmiany ekspresji zaprezentowane na mapach cieplnych na rys. 4.16 (str. 77-78) są istotne statystycznie? Doceniając ten sposób przedstawienia danych pozwalający łatwo dostrzec generalny trend, myślę, że nic nie stało na przeszkodzie aby szczegółowe wyniki zostały zamieszczone w załączniku, podobnie do wyników ekspresji genów związanych z apoptozą, stresem oksydacyjnym i szlakiem NF- $\kappa$ B w komórkach SW620D.

Dyskusja wyników zawarta jest w 13-stronnicowym omówieniu, w którym Doktorant w sposób dojrzały odnosi własne wyniki do badań innych autorów. Mam do tej części pracy jedynie dwie drobne uwagi:

- 1) Co Doktorant rozumie przez następujące stwierdzenie ze str. 99: „Zmniejszenie poziomu glutationu w komórkach z nadekspresją ABCG2 należy zatem przypisać długotrwałej modulacji poziomu glutationu komórkowego”?
- 2) Na str. 105 Doktorant stwierdza, że obserwowane zmiany ekspresji genów w komórkach SW620D „...są dowodem na to, że nadekspresja transporterów wielolekowych wprowadza zmiany w ekspresji genów wielu zróżnicowanych szlaków metabolicznych.” Nie do końca mogę się tym zgodzić. Linia komórek SW620D powstała w wyniku poddania komórek macierzystej linii komórkowej SW620 selekcji na doksorubicynę. Uzyskanej przez komórki oporności na doksorubicynę towarzyszą zmiany ekspresji genu *ABCBI* oraz innych genów. Nie musi być tak, że to nadekspresja *ABCBI* wywołała zmiany ekspresji pozostałych genów. Można byłoby tak twierdzić gdyby nadekspresja *ABCBI* została uzyskana na drodze manipulacji genetycznych. Na podobnej zasadzie dyskusyjne wydaje się stwierdzenie ze str. 101, iż „Zwiększona aktywność *ABCBI* jest najwyraźniej odpowiedzialna za niższy poziom ATP w komórkach SW620D w porównaniu do linii podstawowej”.

Podsumowując stwierdzam, iż rozprawa doktorska Pana mgr Damiana Krzyżanowskiego jest oryginalnym osiągnięciem naukowym wzbogacającym naszą wiedzę o biologii nowotworów i mimo przedstawionych uwag krytycznych spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane pracom doktorskim. Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pana mgr Damiana Krzyżanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz ze względu na wysoki poziom naukowy, wnioskuje o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej.



Dr hab. Kamil Brzoska, prof. IChTJ