

Łódź, 19-XII-2022 r.

Prof. dr hab. n. farm. Bolesław T. KARWOWSKI
Zakład Bromatologii UM w Łodzi
ul. Muszyńskiego 1
90-151 Łódź
tel. 42 6779140
e-mail.: Boleslaw.Karwowski@umed.lodz.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny SZATKOWSKIEJ

Magister Magdalena SZATKOWSKA wykonała swoją pracę doktorską pt. *Paralogi RAD51 w naprawie międzyniciowych wiązań poprzecznych w komórkach raka trzonu macicy* w Katedrze Genetyki Molekularnej, Instytutu Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi pod kierunkiem Pani dr hab. Renaty KRUPY. Tematyka dysertacji jest kontynuacją i rozwinięciem badań prowadzonych od lat przez Promotora pracy nad polimorfizmem genów biorących udział w naprawie podwójnych pęknięć nici w obrębie DNA, o czym świadczą publikacje w czasopismach o międzynarodowym zasięgu. Należy podkreślić, iż recenzowana praca doktorska powstała w oparciu o wyniki uzyskane w ramach dotacji wspierającej prace badawcze Młodych Naukowców udzielonej przez Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Dysertacja magister Magdaleny Szatkowskiej przedstawia uzyskane wyniki w odmiennym od klasycznego układzie edytorskim przewidzianym dla rozpraw doktorskich, zawierającym:

- listę stosowanych w tekście skrótów,
- informacje o finansowaniu badań,

- wstęp, w którym oprócz omówienia zagadnień związanych z nowotworami błony śluzowej trzonu macicy również został zaprezentowany aktualny stan wiedzy dotyczący paralogów RAD51, ich biologiczne znaczenia w szlaku napraw materiału genetycznego na drodze homologicznej rekombinacji. Ponadto w tej części zostały podjęte próby omówienia małowzrostkowych związków o aktywności terapeutycznej, jak również zwrócono uwagę na możliwość wykorzystania mikroRNA jako czynnika regulującego ekspresję wybranych genów,
- uzasadnienie podjętej w doktoracie tematyki z wyszczególnieniem jej głównych celów,
- opis przeprowadzonych przez Doktorantkę prac eksperymentalnych oraz stosowanych odczynników i technik badawczych,
- podsumowanie otrzymanych wyników wraz z dyskusją i wnioskami końcowymi.

Autorka w swojej dysertacji na 135 stronach umieściła: 36 rysunków i 12 tabel, które we właściwy sposób prezentują dane naukowe, a zamieszczone na 34 stronach piśmiennictwo, z uwzględnieniem najnowszych doniesień literaturowych, dodatkowo świadczy o dobrej znajomości rozważanych problemów badawczych, co jest wymagane od osób ubiegających się o stopień doktora.

Praca doktorska kończy się wykazem dorobku naukowego Pani mgr Magdaleny Szatkowskiej. Pan Magister była współautorem 4 publikacji naukowych o zasięgu międzynarodowym o łącznym współczynniku oddziaływania (IF) 23,052 oraz jednej publikacji krajowej. Sumaryczna punktacja dorobku naukowego zgodna z wykazem czasopism Ministerstwa Edukacji i Nauki wynosi: 485 punktów. Ponadto Doktorantka jest autorką trzech komunikatów konferencyjnych.

Przed przystąpieniem do omówienia i oceny przedłożonego mi manuskryptu, muszę zwrócić uwagę na pewną niedogodność/trudność w ocenie mgr Magdaleny Szatkowskiej. Nigdzie w tekście nie odnotowałem informacji o rodzaju prowadzonych zajęć dydaktycznych w ramach studiów doktoranckich ani na temat czasu realizacji prowadzonych badań. Dużym zaskoczeniem dla mnie było zastosowanie niestandardowego układu edytorskiego dysertacji, w tym zamieszczenie na końcu, a nie na początku pracy: celów pracy oraz wykazu publikacji będących pośrednio efektem przeprowadzonych i opisanych w tekście prac eksperymentalnych.

Ze względu na złożoność tematyki pracy, jak i różnorodność zadań badawczych, podjąłem decyzję o omówieniu i merytorycznej ocenie dysertacji zgodnie z jej chronologicznym układem.

Wprowadzenie i Część literaturowa

Na 28 stronach dysertacji Autorka przedstawiła zwięźle i merytorycznie problemy społeczne związane z rakiem błony śluzowej trzonu macicy. Zgodnie z oczekiwaniami, z diagnostycznego punktu widzenia, skale określające inwazyjność oraz stopień zaawansowania nowotworów zostały poprawnie przedstawione zarówno dla system TNM, jak również system FIGO. W dalszej części Autorka podjęła próbę opisu obecnie stosowanych terapii przeciwnowotworowych z uwzględnieniem podstawowych, opartych na analogach cisplatyny, terapii skojarzonych, jak również nowoczesnych strategii opartych na małowzrostkowych inhibitorach białek (np.: PARP-1) biorących udział w szlakach naprawy materiału genetycznego. Warty podkreślenia jest fakt, iż w tej części pracy uwaga została zwrócona również na mutację w obrębie RAD51B, RAD51C i XRCC3. Natomiast uwzględnienie roli paralogów RAD51 w naprawie pęknięć dwuniciowych DNA z jednoczesną próbą dyskusji w kwestii uwrażliwiania komórek nowotworowych na działanie kompleksów platyny (celem zwiększenia bezpieczeństwa i skuteczności terapii) wprowadza czytelnika pracy w obszar zainteresowań badawczych Pani Magdaleny Szatkowskiej. W mojej ocenie brakuje jednakże, w tej części opisu, innych systemów naprawczych DNA poza omawianym szlakiem naprawy homologicznej. Ze względu na powyższe oczekuję, iż ta niedogodność zostanie uzupełniona w trakcie obrony ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmu NHEJ. Drugą niedogodność stanowi brak opisu mechanizmu działania związków opartych na modelu cisplatyny. Zamieszczony opis (Rysunek 4) wymaga doprecyzowania i wyjaśnienia/korekty. Trudno jest mi się również zgodzić ze stwierdzeniem: *Właściwości przeciwnowotworowe wykazuje wyłącznie cisplatyna, ponieważ izomer trans, ze względu na swoją budowę przestrzenną, nie może tworzyć wiązań krzyżowych z DNA*. Wykazano, iż jeśli komórki nowotworowe poddane uprzednio naświetleniu promieniami UVA zostały poddane działaniu związków transplatyny to obserwowano efekt cytotoksyczności na poziomie cisplatyny. Ponadto w tej i dalszej części pracy występuje oryginalne stwierdzenie: „wiązania poprzeczne DNA”, w kontekście pracy sugerowałbym stosowanie terminów wiązania między- lub wewnątrz- niciowe lub po prostu terminu: *cross-link*.

Podsumowując tą część pracy doktorskiej, mimo w/w sugestii, chciałbym zwrócić uwagę, iż mgr Magdalena Szatkowska wykazała się pożądaną cechą badacza: stawianiem pytań w oparciu o posiadaną wiedzę i dążeniem do ich rozwiązania za pomocą właściwych metod

biologicznych, analitycznych i biochemicznych, co zostało, zgodnie z moimi oczekiwaniami jako recenzenta, potwierdzone w kolejnej części pracy.

Badania własne.

Temat badawczy dysertacji skoncentrowany jest wokół istotnego społecznie problemu, jakim jest terapia nowotworów błony śluzowej tronu macicy. Prezentowane przez Doktorantkę wyniki badań, otrzymanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej, koncentrują się wokół rozwiązania trzech głównych problemów badawczych, stanowiących wspólną całość zagadnień omówionych poniżej:

- 1) wpływ paralogów RAD51 oraz miRNA, wyciszających transkrypty genów *RAD51C* i *SWSAP1*, na efektywność naprawy międzyniciowych wiązań w obrębie podwójnej helisy w komórkach linii Ishikawa i HEC-1-A, w odpowiedzi na chemioterapię,
- 2) efektywność tworzenia i naprawy międzyniciowych wiązań DNA w odpowiedzi na inhibicję miRNA i kinazy DNA-PK.
- 3) ocena właściwości proapoptotycznych cisplatyny w odpowiedzi na inhibicję miRNA i kinazy DNA-PK (skojarzone działanie inhibitorów DNA-PK i miRNA).

Pani magister Magdalena Szatkowska rozpoczęła swoje badania od ustalenia cytotoksyczności znanych związków platyny w kierunku komórek linii Ishikawa i HEC-1-A jako podstawy do dalszych rozważań naukowych. Ponieważ znane jest występowanie odporności komórek nowotworowych na stosowane chemioterapeutyki w kolejnym kroku została podjęta próba określenia efektu wyciszenia genów *SWSAP1* i *RAD51C*. Uzyskane wyniki przeprowadzonych eksperymentów jednoznacznie wskazały, iż wyciszenie genu *SWSAP1* prowadzi wyłącznie do uwrażliwienia komórek linii HEC-1-A na działanie CDDP. Natomiast wyciszenie, zarówno w komórkach linii Ishikawa, jak i HEC-1-A, genu *RAD51C* prowadziło do wzrostu cytotoksyczności badanego kompleksu platyny. Obiecujące wyniki skłoniły zapewne Doktorantkę do podjęcia prób określenia lokalizacji białka RAD51 wraz ze swoim paralogiem SWSAP1 w świetle komórki. Określono, że powyższe białka zlokalizowane są w jądrze komórkowym oraz cytoplazmie, co pośrednio sugeruje ich udział w procesach naprawy materiału genetycznego, którego uszkodzenie nastąpiło pod wpływem cis-diaminodichloroplatyny(II) (indukcja). Badania te w dalszej części potwierdziły wpływ CDDP na poziom białek w obydwu

badanych liniach po ekspozycji na działanie czynnika uszkadzającego. Poprzez wykonanie testu kometowego Pani Magister wykazała wrażliwość komórek linii Ishikawa na działanie CDDP poprzez zmniejszenie efektu „ogonowania”, co wskazuje na wysoką efektywność tworzenia wiązań międzyniciowych w obrębie podwójnej helisy. Ponadto Doktorantka wykazała, iż wyciszenie ekspresji *RAD51C* nie wpływa na ekspresję *SWSAP1*, z drugiej strony wyciszenie *SWSAP1* powodowało wzrost ekspresji *RAD51C* w niemalże wszystkich próbach, w których komórki linii Isikawa i HEC-1-A były poddane działaniu CDDP. Natomiast wyniki badań przeprowadzonych przy zastosowaniu inhibicji miR-125a-5p i miR-2050-5p wraz z skojarzonym działaniem CDDP i NU7026 wykazały wzrost komórek apoptotycznych linii Ichikawa. Ta ostatnia obserwacja wydaje się być bardzo istotna z punktu widzenia tworzenia nowych strategii terapeutycznych.

Pod względem edytorskim praca napisana została starannie, choć nie jest wolna od usterek, które nie mają wpływu na jakość dysertacji. Nie jest to praca filologiczna. Pewną niedogodnością jest brak schematów badanych związków poza CDDP omawianych w tekście, jak również nadmiernie rozbudowane podsumowania i wyniki pojawiające się w niestandardowych miejscach dysertacji. Niemniej praca została napisana zgodnie z wymogami stawianymi rozprawom doktorskim.

Po przeanalizowaniu przedstawionego materiału nasunęły mi się trzy zagadnienia, dotyczące części teoretycznej i badawczej, a nie uwzględnione w kolejnych etapach dyskusji:

- 1) Brak jest, według mnie, w części teoretycznej, porównania mechanizmów naprawy materiału genetycznego ze szczególnym uwzględnieniem systemu NER i NHEJ. Również zabrakło mi we wstępie przybliżenia znaczenia substancji aktywnych innych niż kompleksy platyny, których aktywność terapeutyczna oparta jest na tworzeniu wiązań typu *cross-link*. Poświęcenie choćby krótkiego fragmentu pracy tym zagadnieniom uwypukliłoby konieczność poszukiwania nowych strategii badawczych.
- 2) Wartym byłoby omówienie mechanizmu działania cisplatyny w kontekście oddziaływania z ds-DNA, jak również omówienie procesu ADME jakiemu podlegają substancje po padaniu do organizmu, zarówno drogą parenteralną jak i *per os*.
- 3) Interesujące byłoby też udzielenie informacji, ile wiązań międzyniciowych w obrębie genomu wywołuje efekt letalny w komórce eukariotycznej.

Podsumowując: Przedstawioną rozprawę doktorską pt. *Paralogi RAD51 w naprawie między niciowych wiązań poprzecznych w komórkach raka trzonu macicy* cechuje zwięzłość we wszystkich jej częściach i bogata szata graficzna. Dzięki temu możliwe było zaprezentowanie na 97 stronach tekstu dużej ilości badań. Sposób prezentowania badań naukowych w dysertacji potwierdza, iż Doktorantka potrafi planować i prowadzić zadania naukowe oraz że dysponuje odpowiednią wiedzą z zakresu biologii i biochemii kwasów nukleinowych. W trakcie recenzowania przedstawionej mi pracy nie znalazłem podstaw do poważnej krytyki merytorycznej rozprawy.

Po zapoznaniu się z przedstawioną dysertacją stwierdzam, iż mgr Magdalena SZATKOWSKA wykonała i przedstawiła dobrą rozprawę doktorską udowadniając, iż jest młodym naukowcem, zdolnym do prowadzenia badań naukowych. Ze względu na powyższe wnioskuję o dopuszczenie mgr Magdaleny SZATKOWSKIEJ do dalszych etapów związanych z przewodem doktorskim.

