

Rzeszów, 09.11.2023 r.

Prof. dr hab. Marek Koziarowski, dr h.c.
Instytut Biotechnologii
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Rzeszowski

OCENA

rozprawy doktorskiej
mgr Claudii Musiał

pt. Biologiczne implikacje wybranych metabolitów 17β -estradiolu w regulacji mechanizmów śmierci i przeżywalności komórek ludzkiego gruczolaka płuc, określone na podstawie dwuwymiarowych i trójwymiarowych modeli komórkowych

**Recenzja została wykonana na wniosek Rady Nauk Medycznych Gdańskiego
Uniwersytetu Medycznego z dnia 28 września 2023 r.**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska wykonana została w Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod opieką naukową Promotora dr hab. Magdaleny Górskiej-Ponikowskiej, profesora GUMed w ramach Pierwszej Szkoły Doktorskiej GUMed.

Podstawę do ubiegania się o stopień doktora stanowią dwie oryginalne prace naukowe opublikowane w latach 2021 i 2022 w czasopismach z listy JCR, których łączny współczynnik oddziaływania Impact Factor wynosi 16,01 i punktacja ministerialna łącznie 280 punktów, przedstawione poniżej:

1. Musiał, C.; Zaucha, R.; Kuban-Jankowska, A.; Konieczna, L.; Belka, M.; Marino Gammazza, A.; Baczek, T.; Cappello, F.; Wozniak, M.; Gorska-Ponikowska, M.: *Plausible Role of Estrogens in Pathogenesis, Progression and Therapy of Lung Cancer*, Int. J. Environ. Res. Public Health 2021, 18, 648,

- Musial C, Knap N, Zaucha R, Bastian P, Barone G, Lo Bosco G, Lo-Celso F, Konieczna L, Belka M, Bączek T, Gammazza AM, Kuban-Jankowska A, Cappello F, Nussberger S, Gorska-Ponikowska M.: *Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer*, Redox Biol. 2022 Jul 8;55:102395.

W zaprezentowanym do oceny manuskrypcie Doktorantka zawarła również wyniki, które nie zostały umieszczone w załączonych pracach, co sprawia, że dysertacja ma charakter hybrydowy, co zdaniem recenzenta pozwoliło Doktorantce zaprezentować również najbardziej aktualne wyniki, co istotnie podnosi wartość prezentowanych badań. Dodatkowo Doktorantka cytuje prace Katedry i Zakładu Chemii Medycznej, co świadczy o Jej znajomości tematyki badawczej w jednostce prowadzącej. W bazie bibliometrycznej Scopus jest 6 razy indeksowana z współautorami z Katedry jako pierwszy autor, oraz 2 razy jako współautor, z 378 cytowaniami, indeks Hisha 6 (dostęp z dnia 04.11.2023). Taka aktywność w ciągu ostatnich czterech lat świadczy o dużym zaangażowaniu w badaniach i o zdolności publikacyjnej.

Badania wchodzące w skład dysertacji zostały sfinansowane w ramach Projektu Badawczego dla Młodych Naukowców Programu IDUB MTN nr 71–1203 (Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, Polska) oraz ST46 (Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, Polska). Niezbędne odczynniki zostały sfinansowane przez projekt MTN 664/259/61/71-1203 oraz POWR.03.05.00-00-z082/18.

Przedstawiony do oceny manuskrypt, wraz z piśmiennictwem liczy 100 stron. Badania wraz z wynikami przedstawione zostały graficznie w postaci 2 tabel, 3 schematów i 11 rycin. Zawiera następujące rozdziały: Wykaz stosowanych skrótów, Publikacje będące przedmiotem dysertacji, Wsparcie projektu, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wprowadzenie, Cel pracy, Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Pozostałe publikacje naukowe oraz książki autorskie, Wystąpienia konferencyjne, Członkostwo w stowarzyszeniach naukowych, Uczestnictwo w projektach badawczych, Piśmiennictwo, Spis tabel i rycin oraz Publikacje wchodzące w skład hybrydowej rozprawy doktorskiej.

Rozdziały 1-5 stanowią informacje oraz streszczenia w języku polskim i angielskim dotyczące zaprezentowanego autoreferatu. Rozdział 6 zatytułowany Wprowadzenie w opinii recenzenta stanowi krótki przegląd światowego piśmiennictwa, w którym Doktorantka zaprezentowała wiedzę ściśle związaną z wykonywanymi badaniami. Rak płuca, ze względu na częstotliwość występowania (ok. 22 000 nowych przypadków rocznie w Polsce) i niezwykle wysoką śmiertelność (wskaźnik 5-letniego przeżycia u chorych na raka płuca wynosi tylko

13,4%) stawia przed pracownikami nauki z obszaru onkologii coraz to nowsze wyzwania w poszukiwaniu metod terapii. Jest to najbardziej śmiertelny spośród wszystkich nowotworów w Europie i na świecie. Każdego roku w Polsce z powodu raka płuca umiera blisko 20 tys. osób. To więcej niż na raka piersi, raka jelita grubego i raka prostaty razem wziętych. W ostatnich latach Doktorantka wykazała w swoich badaniach istotnie większą częstotliwość występowania raka płuc u kobiet niż u mężczyzn (trzykrotnie wyższa). Skłoniło ją to do wniosku, że obok czynników ekspozycyjnych, genetycznych i epigenetycznych istotne znaczenie wydają się mieć hormony płciowe. Od lat znany jest fakt, że estradiol jest hormonem kancerogennym. Podwyższona synteza 17β -estradiolu zwiększa proliferację niedrobnokomórkowych guzów płuc, co wpływa negatywnie na rokowanie. Podobnie, choć słabiej wydaje się działać estron, jak również katecholoestrogeny. Odwrotnie działają metoksyestrogeny niwelując działanie estradiolu, estronu i katecholoestrogenów. Warto zaznaczyć, że antynowotworowe działanie 2-metoksyestradiolu (2-ME) w licznych publikacjach prezentowała Górska-Ponikowska i wykazała, że może on być stosowany jako skuteczny środek przeciwnowotworowy w terapii kostniakomięsaka, nerwiaka niedojrzałego i innych guzów litych. Nie bez znaczenia w rozwijających się tkankach nowotworowych jest również obecność receptorów estradiolowych zarówno α , jak i β , a ich wysoka ekspresja jest markerem prognostycznym dla chorych na raka płuc. Na podstawie badań własnych Autorka sugeruje, że O-metylacja 2-hydroksykatecholesterolu wydaje się być fizjologicznym mechanizmem ochrony przeciwnowotworowej, a 2-metoksyestradiol może być potencjalnym biomarkerem klinicznym, czy w przyszłości lekiem z wyboru. Oznaczanie we krwi i moczu pacjentów metabolitów 17β -estradiolu, estronu, katecholoestrogenów, jak i metoksyestrogenów działających proliferacyjnie lub apoptotycznie, może być istotnym czynnikiem diagnostycznym co do przewidywań rozwoju nowotworu. W miarę dobrze poznany jest udział metabolitów w rozwoju raka piersi. Stosunek między 2-hydroksyestronem (2-OHE1), a 16α -hydroksyestronem (16α -OHE1) – szlak 2 wykazuje odpowiednio ochronne działanie, a szlak 16 bierze udział w hyperprolifracji. Mając na uwadze, że średni poziom estrogenów jest wyższy u kobiet, niż u mężczyzn wydaje się zrozumiałe dlaczego kobiety częściej chorują na raka płuc. Zbieżność ta jest obserwowana również w raku piersi, a w piśmiennictwie znajdziemy dane, pokazujące, że mechanizm działania estrogenów w raku płuc jest zbliżony do mechanizmu w raku piersi. Powyższe dane pozwoliły Autorce dysertacji postawić jasny cel badań. Głównym celem badań jest określenie funkcji wybranych metabolitów 17β -estradiolu – katecholoestrogenów i metoksyestrogenów w regulacji rozwoju lub śmierci komórek nowotworów płuca. W głównej mierze używała metody hodowli *in vitro* z wykorzystaniem

dwu i trójwymiarowych (2D i 3D) modeli gruczolaka płuca. Szczególnie cenna wydaje się być metoda 3D, gdzie w hodowli *in vitro* naśladujemy naturalne warunki guzów nowotworowych w warunkach laboratoryjnych ze szczególnym uwzględnieniem mikrośrodowiska sterydów.

W publikacji 1: *Prawdopodobna rola estrogenów w patogenezie, postępie i terapii raka płuc*, Autorka podsumowuje aktualną wiedzę na koniec 2020 roku na temat roli estrogenów w etiopatogenezie raka płuc, a także następstwo gruczolaka płuca u kobiet. Omawia główne czynniki wpływające na rozwój raka, takie jak: palenie tytoniu, zanieczyszczenie środowiskowe, przewlekłe infekcje, uwarunkowania genetyczne czy hormony płciowe. Analizuje liczbę zachorowań w krajach europejskich oraz różnice płciowe u chorych. Wykazuje, że kobiety mogą być bardziej podatne na działanie dymu tytoniowego, niż mężczyźni. Co istotne, wykazuje znacznie częstszą mutację genu supresorowego nowotworu p53 u pacjentek z niedrobnokomórkowym rakiem płuc, w porównaniu do mężczyzn. Również wskazuje na korelację pomiędzy HTZ lub doustnymi środkami antykoncepcyjnymi, a zwiększoną śmiertelnością, spowodowaną zwiększoną częstotliwością występowania nowotworów złośliwych.

W publikacji 2 - *Indukcja O-metylacji 2-hydroksykatecholesterolu: brakujący element układanki w diagnostyce i leczeniu raka płuc*, celem badań było przedstawienie wpływu endogenego metabolitu 17β -estradiolu w postaci 2-metoksyestradiolu (2-ME) na komórki niedrobnokomórkowego raka płuc, mierzonego metodą *in vitro*. Wyniki wykazały, że 2-metoksyestradiol zmniejsza żywotność gruczolaka płuca oznaczaną w dwuwymiarowych i trójwymiarowych hodowlach komórkowych linii A549. Potwierdzono śmierć komórkową indukowaną 2-metoksyestradiolem oraz wykazano mechanizm działania 2-ME na indukcję stresu nitrooksydacyjnego. Uzyskane wyniki Doktorantki korelują z wynikami badań innych ośrodków naukowych, co potwierdza nie tylko przedstawiony cel badań ale umacnia założoną tezę, co do hormonozależności nowotworów płuca. Od lat wiadomym było o ścisłym współdziałaniu układu hormonalnego, głównie u kobiet, a wzrostem zachorowalności na raka płuca. Wobec powyższego na bazie uzyskanych wyników Doktorantka stawia tezę, że szerokie celowanie w poziomy estrogenów u pacjentów z rakiem płuca jest wysoko obiecującym działaniem diagnostycznym, monitorującym i terapeutycznym. Na podstawie uzyskanych wyników dowiedziono, że estrogeny E1, E2, E3 oraz ich metabolity: 2-hydroksyestron, 2-hydroksyestradiol, 4-hydroksyestron, 4-hydroksyestradiol, 2-metoksyestron oraz 2-metoksyestradiol wykazują wyższy poziom w tkance nowotworowej płuca, w porównaniu do tkanki kontrolnej zdrowych kobiet. Doktorantka sugeruje, iż prawdopodobnie możliwe będzie

zastosowanie estrogenów hydroksylowanych oraz metylowanych w pozycji 2 do diagnostyki nowotworów płuc.

Najnowsze doniesienie sugerują, że jednym z istotnych punktów w zakresie supresji nowotworu jest ferroptoza – wewnątrzkomórkowa śmierć komórki zależna od żelaza. Powstaje w wyniku gromadzenia się reaktywnych form tlenu oraz zaburzenia metabolizmu żelaza. Wysoki poziom stresu oksydacyjnego jest skorelowany z ferroptozą. Wyniki badań Doktorantki wskazują, że produkcja reaktywnych form tlenu rośnie po zadziałaniu na komórki linii A549 2-metoksyestradiolem. Dalszym etapem badań, których wyników Doktorantka nie umieściła w publikacji, było ich rozszerzenie z użyciem linii komórkowej A549 i użycie 2-metyksoestradiolu wraz z ferostatyną1, inhibitorem ferroptozy i 3-Bromopirogronianem. 3-Bromopirogronian wpływa na uwalnianie mleczanu w ludzkich komórkach gruczolakoraka płuca A549. W badaniach Doktorantki porównujących działanie 2 metoksyestradiolu i 3-Bromopirogronianu na linię komórkową A549 najwyższą skuteczność wykazała kombinacja obu tych reagentów. Doktorantka wykazała, że ferroptoza może stanowić potencjalny cel terapeutyczny w przypadku gruczolakoraka płuc. Potwierdziła skuteczność 2-metoksyestradiolu w hodowli komórek sferoidalnych imitującej naturalne środowisko guza nowotworowego. Doktorantka określiła również indukcję nekroptozy w hodowli 3D komórek A549 po zastosowaniu 2- metoksyestradiolu. W komórkach traktowanych nekrostatyną-1 nie wykazano śmierci komórek, najwyższą śmiertelność wykazano po zastosowaniu samego 2-metyksoestradiolu, który, jak wykazała Doktorantka indukuje nekroptozę. Wszystkie wyniki zaprezentowane w dysertacji stanowią cenny wkład do nauki światowej, a część z nich prezentowana jest po raz pierwszy.

W pracy doktorskiej Doktorantka przedstawiła wyniki jako średnia \pm SD. Dane analizowała przeprowadzając jednokierunkową ANOVA (analiza wariancji) połączoną z testem post hoc wielokrotnego porównania Dunnetta. Zastosowała oprogramowanie GraphPad Prism 9.0. Wyniki badania klinicznego analizowane były przy użyciu pakietu IBM SPSS Statistics, testem Kruskala-Wallisa. W przypadku różnic istotnych statystycznie stosowano test post-hoc Gamesa-Howella. Przy porównywaniu dwóch grup badawczych stosowano test U Manna-Whitneya. Zależność istotną statystycznie określano za pomocą analizy korelacji Spearmana.

Po przeprowadzeniu badań Doktorantka wysunęła następujące wnioski: specyficzne działanie wybranego metabolitu 17 β -estradiolu w postaci 2-metoksyestradiolu na komórki ludzkiego gruczolakoraka płuc w hodowlach 2D i 3D, polega na:

- działaniu cytotoksycznym i zmniejszeniu żywotności linii komórkowej A549, również w modelu 3D sferoidalnym, imitującym warunki *in vivo*;
- mechanizmie polegającym na indukcji stresu nitro – oksydacyjnego;
- mechanizmie śmierci komórkowej polegającym na aktywacji ferroptozy, oraz nekroptozy;
- potencjalnej korzyści klinicznej dzięki działaniu przeciwnowotworowemu.

Dowodła także zastosowanie estrogenów jako potencjalnych markerów gruczolaka płuca.

Podsumowując Autorka w dysertacji wykazała znaczącą interakcję i wzmocnione działanie przeciwko linii ludzkich komórek gruczolaka płuca A549 2-metoksyestradiolu w połączeniu z 3-Bromopirogronianem, potwierdziła, że 2-metoksyestradiol hamuje żywotność komórek nowotworowych, wykazując śmierć komórki w postaci ferroptozy i nekroptozy. Badania prowadziła wykorzystując trójwymiarowy model komórek sferoidalnych, które naśladują stan *in vivo* guza i jego mikrośrodowisko. Model 3D jest nową perspektywą terapeutyczną w leczeniu onkologicznym. Doktorantka określiła również stosunek metabolitów estrogenów. Potwierdziła istnienie silnej zależności w stosunku wybranych metabolitów hormonów steroidowych u pacjentów z gruczolakorakiem płuc, co ma dużą kliniczną wartość prognostyczną.

Reasumując, przedstawione do recenzji opracowanie stanowi istotny wkład do nauki i poznania nowych metod diagnozowania, jak i leczenia gruczolaka płuc, zarówno w aspekcie poznawczym, jak i aplikacyjnym. Zastosowanie najnowszych metod badawczych (hodowla komórkowa w modelu 2D i 3D, cytometria przepływowa, mikroskopia fluorescencyjna, detekcja luminescencji i fluorescencji) i dostęp do sprzętu najwyższej jakości pozwoliło Doktorantce poznać mechanizmy dotychczas niedostępne do określenia.

Doktorantka w manuskrypcie załączyła również wykaz pozostałych publikacji książek autorskich oraz publikacji naukowych. Dołączyła również wykaz wystąpień konferencyjnych oraz grantów, w których brała czynny udział.

W ocenianym opracowaniu Doktorantka wykazała się dobrym opanowaniem warsztatu badawczego, zrozumieniem rozpatrywanych problemów i znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje moim zdaniem doskonały wybór tematyki badawczej, który jest i kontynuacją i poszerzeniem wiedzy poznawanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Istota hormonozależności znana była od dość dawna, jednakże dopiero badania z końca lat 60-tych XX wieku dotyczące określenia koncentracji receptorów estradiolowych jako specyficznych chwytników $17\beta E2$ wykazały zwiększoną ilość receptorów w tkankach nowotworowych gruczołu mlekowego. Badania prowadzone w Olsztynie w latach 70-tych XX

wieku, wykazały zwiększoną ilość receptorów, szczególnie estradiolowych w guzach piersi i guzach mózgu. Stanowiło to istotny postęp, jednakże dzisiaj wiemy, że uzyskana wtedy odpowiedź uwzględniała wyłącznie reakcję na estradiol 17β , nie uwzględniając zupełnie funkcji ich metabolitów. Chromatografia była wtedy na bardzo niskim poziomie i nie było możliwości oznaczania tych metabolitów. Zdaniem recenzenta należy podkreślić rangę prowadzonych przez Doktorantkę, jak i Katedrę badań. Metody umieszczone w badaniach Doktorantki zdaniem recenzenta (nie onkologa, a endokrynologa) powinny być wdrożone do praktyki diagnostycznej i terapeutycznej w obszarze onkologii.

Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorantka posiada ważne w pracy badawczej cechy, takie jak pracowitość, solidność i dociekliwość.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Claudii Musiał pt. *Biologiczne implikacje wybranych metabolitów 17β -estradiolu w regulacji mechanizmów śmierci i przeżywalności komórek ludzkiego gruczolaka płuc, określone na podstawie dwuwymiarowych i trójwymiarowych modeli komórkowych* w opinii recenzenta spełnia wszystkie wymagania – określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2021 r. poz. 478 ze zm.) – stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie mając na uwadze wysoki poziom naukowy zaprezentowanych badań i ich twórczy charakter, co również uznali recenzenci kwalifikujący prace do druku w czasopiśmie o światowym zasięgu, pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie w pełni uzasadniony moim zdaniem wniosek o wyróżnienie pracy, którego najlepszym uzasadnieniem niech będzie podsumowanie zaprezentowanych wyników badań łacińską maksymą „Ad Bonum Hominis”.

