

Łódź, 30 maja 2015

Profesor dr hab. n. med. Krzysztof Lewandowski
specjalista chorób wewnętrznych, endokrynologii i diabetologii
Członek Królewskiego Kolegium Lekarskiego (Wielka Brytania)
Klinika Endokrynologii i Chorób Metabolicznych
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki
Rzgowska 281/89; 93-338 Łódź
Tel.: 42 271-11-41
Fax: 42 271-11-40

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Pauliny Szyszki

pod tytułem

Ocena wpływu wybranych inhibitorów szlaków PI3K/Akt/MTP oraz RAF/MEK/ERK na proliferację i apoptozę ludzkiej linii komórkowej raka kory nadnercza H295R.

Podjęcie przez Doktorantkę tematyki badań związanych z rakiem kory nadnercza ma istotne znaczenie zarówno z punktu widzenia klinicznego, jak i naukowego. Nowotwory te charakteryzuje bowiem niepomyślne rokowanie, stosunkowo niski odsetek wyleczeń z częstymi nawrotami choroby, w tym również z częstą wznową miejscową, pomimo, jak się wcześniej wydawało, całkowitej resekcji

guza. Możliwości farmakoterapii raka kory nadnercza są również ograniczone, zaś praktyka ogranicza się zwykle do stosowania mitotanu, będącego w zasadzie jedynym lekiem, co do którego opracowano ujednolicone standardy zastosowania klinicznego.

Z punktu widzenia naukowego raki kory nadnerczy charakteryzują się również ciekawymi procesami biologicznymi polegającymi na eliminacji części (a nawet do 50%) oryginalnego materiału genetycznego (zjawisko hipodiploidii) (Assie G. *et al. Nat Gen* 2014; 46: 607-12, Juhlin CC *et al. J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E493-502). Raki kory nadnerczy charakteryzują się między innymi zaburzeniami funkcji jednego z najstarszych ewolucyjnie szlaków metabolicznych - Wnt/ β -kateniny - odgrywającego rolę zarówno w adhezji komórek, jak i w embriogenezie oraz w transformacji nowotworowej (Fuchs SY. *Cell Cycle* 2005; 4: 1522-39). Mutacje wyżej wymienionego szlaku metabolicznego opisywane są również w linii komórkowej H295R wykorzystanej w niniejszej pracy (Tissier F. *et al. Cancer Res* 2005; 65: 7622-7627). Doktorantka słusznie podkreśla, że linia komórkowa H295R jest najlepszym dostępnym materiałem biologicznym do badań nad rakiem kory nadnerczy w warunkach *in vitro*, gdyż komórki tej linii zachowały zdolność do syntezy hormonów kory nadnerczy w szlaku mineralo- i glukokortykosterydowym, jak również zdolność do sekrecji androgenów nadnerczowych.

W warunkach polskich istnieje jeszcze jeden powód, dla którego podjęcie tematyki leczenia raka kory nadnerczy ma niezwykle istotne znaczenie. Powodem tym jest bardzo słaba, żeby nie powiedzieć wręcz tragiczna dostępność do leczenia dla pacjentów z rakiem kory nadnercza w wielu rejonach Polski. Zastosowanie mitotanu wiąże się bowiem z występowaniem szeregu potencjalnych skutków ubocznych zarówno z punktu widzenia onkologicznego, jak i endokrynologicznego.

Z punktu widzenia endokrynologicznego stosowanie mitotanu powoduje konsekwencje związane, np. z hamowaniem syntezy kortyzolu, co zwykle prowadzi do konieczności substytucji i wiąże się z ryzykiem przetomu nadnerczowego. Oprócz tego zastosowanie mitotanu generuje również inne zaburzenia, np. obniżenie stężeń wolnej tyroksyny (fT4), przy stosunkowo niewielkich zmianach stężeń TSH, przypominających centralną hipotyreozę, zaburzenia osi gonadotropowej, np. z istotnym spadkiem stężeń wolnego testosteronu, do poziomu klinicznego hipogonadyzmu, przy stosunkowo mniejszych zmianach testosteronu całkowitego, spowodowanych znacznym wzrostem stężeń SHBG (*Daffara F et al. Endocrine-Related Cancer 2008;15:1043–1053, Kerkhofs TM et al. J Clin Endocrinol Metab 2013; 98: 4759–4767*). W tej sytuacji, w wielu ośrodkach w Polsce onkolodzy odmawiają podjęcia się leczenia pacjentów z rakiem kory nadnercza obawiając się powikłań endokrynologicznych. Jednocześnie przy braku wspólnych ośrodków endokrynologiczno-onkologicznych w szeregu województw, przytłaczająca większość endokrynologów nie ma prawie żadnych doświadczeń w prowadzeniu pacjentów z rakiem kory nadnercza. Uważam zatem, że poruszenie tematyki diagnostyki i leczenia raka kory nadnercza ma istotne znaczenie edukacyjne na terenie Polski, co zostało już między innymi podjęte przez Panią Profesor Dorotę Dworakowską, promotora recenzowanej rozprawy doktorskiej oraz autorkę najnowszego artykułu poglądowego na temat raka kory nadnercza w literaturze polskiej (*Dworakowska D et al. Endokrynol Pol 2014;65:492-512*).

W swoich badaniach Doktorantka podjęła się oceny działania szeregu leków z grupy inhibitorów szlaku metabolicznego PI3K/Akt/mTOR (Everolimus, NVP-BEZ235, LY294002) oraz inhibitorów szlaku Ras/Raf/MEK/ERK (U0126) na proliferację, aktywność kaspazy-3 oraz ekspresję białek linii komórkowej raka kory nadnercza H295R. Efekty działania leków oceniane były przy tym zarówno w monoterapii, jak i

leczeniu skojarzonym. Doktorantka oceniała również efekty działania leków w połączeniu z mitotaniem, czyli najważniejszym z dotychczas stosowanych leków w raku kory nadnercza. Badania podjęte przez Doktorantkę mogą mieć potencjalnie duże znaczenie kliniczne, gdyż standardowa praktyka ogranicza się zwykle do stosowania mitotanu, zaś zastosowanie leków drugiego rzutu ma nadal charakter eksperymentalny.

Badania oraz wyniki uzyskane w recenzowanej rozprawie mają charakter nowatorski. Doktorantka wykazała, że Everolimus (inhibitor mTOR), NVP-BEZ235 (inhibitor PI3K/mTOR), LY294002 (inhibitor PI3K) oraz U0126 (inhibitor MEK) wykazują silne działanie anty-proliferacyjne na ludzką linię komórkową komórek raka kory nadnercza H295R z nasileniem efektu w zależności od dawki leku. Jest to pierwsza tego typu obserwacja w odniesieniu do preparatów LY294002 oraz U0126. Jest to również pierwsza praca, gdzie wykazano synergizm w działaniu preparatu Everolimus oraz NVP-BEZ235 w działaniu komórki linii H295R.

Doktorantka oceniała też efekty działania mitotanu w różnych stężeniach uzyskując efekt hamowania proliferacji komórek linii H295R, zgodnie z wcześniejszymi danymi z literatury oraz przeprowadziła badania nad skojarzonym zastosowaniem mitotanu oraz wyżej wymienionych substancji (inhibitory szlaku PI3K/mTOR oraz MEK) uzyskując najsilniejszy efekt po zastosowaniu inhibitora MEK – preparatu U0126. Obserwacja ta może mieć znaczenie w praktyce klinicznej, potencjalnie zwłaszcza w przypadkach, gdy z czasem obserwuje się zmniejszenie reakcji lub oporność na mitotan.

Doktorantka oceniała również skuteczność stosowanych substancji w stymulacji apoptozy komórek linii H295R (aktywność kaspazy 3). Wpływ badanych substancji na aktywność kaspazy 3 był mniejszy niż wpływ na żywotność komórek.

Doktorantka wykazała jednak istotny wzrost aktywności kaspazy 3 po łącznym zastosowaniu inhibitora PI3K/mTOR (NVP-BEZ235) oraz inhibitora PI3K (LY294002).

W badaniach oceniających ekspresję białek Doktorantka wykazała najwyższą skuteczność kombinacji preparatu U0126 oraz NVP-BEZ235 wykazując jednocześnie po raz pierwszy możliwość interakcji pomiędzy szlakami metabolicznymi PI3K/Akt/mTOR oraz Ras/Raf/MEK/ERK poprzez zwiększenie fosforylacji tzw. *extracellular signal-regulated protein kinases* (ERK) w warunkach inhibicji szlaku mTOR.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska ma 94 strony i standardowy układ składający się ze wstępu, założeń pracy, opisu materiału i metod oraz dyskusji. Wstęp uzupełniony jest o listę stosowanych skrótów. Zagadnienia omawiane we wstępie oraz wyniki przedstawione są na 21 czytelnych rycinach oraz w siedmiu tabelach.

We wstępie, podzielonym na szereg podrozdziałów, Doktorantka omawia szereg zagadnień związanych z epidemiologią, rozpoznaniem i leczeniem raka kory nadnercza, dalej omawia molekularne podstawy zaburzeń obserwowanych w raku kory nadnercza, związane insulino-podobnym czynnikiem wzrostu II, szlakami metabolicznymi TP53, Wnt/ β -kateniny, cAMP/PKA oraz zaburzeniami steroidogenezy. W podrozdziale 1.1.4 Doktorantka omawia rodzinne zespoły, związane ze zwiększoną częstością występowania guzów nadnerczy, które podsumowuje w czytelnej tabeli. Dalej, w rozdziale 1.2, Doktorantka omawia zagadnienia związane z liniami komórkowymi raka kory nadnercza oraz modele zwierzęce charakteryzujące się zwiększoną częstością występowania guzów nadnercza (w szczególności modele opisane u myszy, fretki i psa). W kolejnych rozdziałach (1.3 i 1.4) Doktorantka omawia szlaki metaboliczne PI3K/Akt/mTor oraz Ras/Raf/MEK/ERK oraz zaburzenia

obserwowane w wyżej wymienionych szlakach metabolicznych w przebiegu raka kory nadnercza. We wspomnianych rozdziałach doktorantka omawia również inhibitory szlaków metabolicznych PI3K/Akt/mTor oraz Ras/Raf/MEK/ERK. Należy podkreślić, że zagadnienia poruszone we wstępie są niezwykle złożone, ale są one omówione w sposób zwięzły i przejrzysty.

W rozdziale opisującym cele badania Doktorantka podjęła się przetestowania hipotezy, że łączne zastosowanie inhibitorów szlaku PI3K/Akt/mTor (Everolimus, NVP-BEZ235, LY294002) oraz inhibitora szlaku Ras/Raf/MEK/ERK (U0126) może zmniejszyć proliferację oraz indukować apoptozę w linii komórkowej ludzkiego raka kory nadnerczy H295R. Doktorantka postawiła sobie za cel przetestowanie też efektów różnych kombinacji wymienionych powyżej substancji, w celu ustalenia, która z nich może wykazywać się synergizmem oraz mieć największy potencjał terapeutyczny. Szerszym celem pracy było poszukiwanie najlepszej formy leczenia złożonego, które oczywiście po przeprowadzeniu odpowiednich prób klinicznych *in vivo*, można potencjalnie zastosować w przypadkach opornych na leczenie monoterapią. Cele pracy nakreślone przez Doktorantkę mogą mieć zatem duże znaczenie kliniczne, biorąc pod uwagę niską przeżywalność u pacjentów z rakiem kory nadnercza, gdzie odsetek pięcioletniego przeżycia nie przekracza zwykle 35 procent.

W rozdziale opisującym materiał i metody, Doktorantka szczegółowo opisuje metodologię prowadzonych badań, opisując między innymi metody hodowli linii komórkowej H295R, zagadnienia kontroli jakości, sposób oceny żywotności komórek przy zastosowaniu resazuryiny, ocenę efektu pro-apoptotycznego na podstawie oceny aktywacji kaspazy-3 oraz zastosowanie metody Western Blot w ocenie profilu ekspresji białek. W podrozdziale 3.7 Doktorantka opisuje metody statystyczne zastosowane w pracy.

Rozdział opisujący wyniki badań napisany jest bardzo przejrzysto, zaś w szczególności zwracają uwagę liczne ryciny w łącznej liczbie czternastu. Doktorantka opisuje najpierw efekty zastosowania mitotanu oraz wszystkich testowanych substancji w monoterapii, zaś następnie w różnych skojarzeniach zarówno bez, jak i przy jednoczesnym zastosowaniu mitotanu. Muszę przyznać, że jestem pod wrażeniem olbrzymiej liczby indywidualnych eksperymentów wykonanych przez Doktorantkę, gdyż w istocie pojedynczy eksperyment opisujący, np. wpływ mitotanu, czy innych substancji na proliferację komórek raka kory nadnercza składał się zwykle z sześciu mniejszych eksperymentów związanych zastosowaniem różnych stężeń badanych substancji (np. dla mitotanu stężeń 5, 10, 15, 20, 25 i 30 μM). Świadczy to o niezwyklej pracowitości i sumienności Doktorantki.

W dyskusji Doktorantka szczegółowo i krytycznie odnosi się do uzyskanych wyników, zaś w podrozdziale 5.5 odnosi się do tematyki związanej z dalszymi badaniami, zwłaszcza do konieczności przetestowania uzyskanych wyników w modelu *in vivo*. Wyniki badań są następnie podsumowane w sześciu głównych wnioskach (strona 88), które to wnioski cytowałem już powyżej.

Na uwagę zwraca bardzo szerokie (200 pozycji) oraz starannie dobrane piśmiennictwo w języku angielskim, obejmujące również najnowsze pozycje z lat 2013 i 2014. Zarówno ilość, jak i różnorodność oraz dobór pozycji piśmiennictwa świadczy o bardzo szerokiej wiedzy doktorantki w zakresie omawianych zagadnień.

Praca napisana jest bardzo płynnie i przejrzysto w języku angielskim, zaś poziom używanego języka, składni oraz zwrotów stylistycznych wskazuje, że była ona pisana od razu po angielsku, nie zaś tłumaczona z języka polskiego. Uważam, że zasługuje to na podkreślenie, gdyż z doświadczenia wiem, że jest często odwrotnie, co często kończy się częściowym zachowaniem polskiej składni i utrudnia czytanie

pracy przez recenzentów obcojęzycznych. Dzięki napisaniu pracy w języku angielskim, jej fragmenty mogą od razu posłużyć do wykorzystania w innych publikacjach, co ułatwia prezentację wyników na forum międzynarodowym.

W związku z nowatorskim oraz bardzo rozległym charakterem badań nasuwa mi się tylko kilka drobnych uwag.

1. Autorka stwierdza (strona 45), że komórki były poddane działaniu wzrastających stężeń mitotanu (5-30 μM) oraz działaniu preparatów Everolimus (stężenie 0,06 μM), NVP-BEZ235 (0,01 μM), LY294002 (1,0 μM) oraz ich kombinacji. W części opisującej wyniki badań autorka wykazuje, że komórki były w istocie poddane zmiennym stężeniom badanych substancji (np. 0.01 do 5,0 μM dla NVP-BEZ235, strona 54, czy 0,2-40 μM dla LY294002, strona 55, czy 0,5-40 μM dla U0126, strona 56). Uważam, że Doktorantka powinna wyjaśnić, na jakiej podstawie ustalono wyjściowe zakresy stężeń i w jakim stopniu stężenia wyżej wymienionych preparatów w warunkach *in vitro*, korelują ze stężeniami tkankowymi uzyskiwanymi w warunkach *in vivo*, również dla innych nowotworów, poza rakiem kory nadnercza.

2. W pracy praktycznie nie ma błędów literowych lub stylistycznych. Sugerowałbym na stronie 9-tej trzeci wiersz od dołu zamienić: "*Majority of patients present advanced, but localised disease*" na "*Majority of patients present **with** advanced, but localised disease*" oraz usunąć "*the*" przed słowami "*clinical presentation*" (początek strony 10-tej).

3. W legendzie do tabeli 5 (strona 79) sugeruję zamianę zwrotu "*quantifies goodness of fit*" na "*quantifies precision of fit*".

4. Ostatnia moja uwaga wiąże się z przekonaniem, że Pani mgr Paulina Szyszka z pewnością uczestniczyła aktywnie w zgłaszaniu streszczeń na międzynarodowe

konferencje naukowe, zarówno w Europie jak i w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej. W związku z tym uważam, że warto by wspomnieć (np. we wstępie lub na przykład w dodatku do pracy), gdzie wyniki badań były dotychczas prezentowane, najlepiej z załączeniem kopii streszczeń zjazdowych lub innych publikacji. Jeżeli bowiem praca, lub jej fragmenty, są prezentowane na konferencjach międzynarodowych, to nie ma nic złego w fakcie, że doktorant się tym pochwali. W Internecie znalazłem m. in. publikacje Doktorantki oraz Pani Profesor Dworakowskiej z San Diego z (97th Annual Meeting and Expo, San Diego, March 2015), pracę ze współautorstwem Doktorantki w International Journal of Molecular Sciences (2015; 16: 6645-6667) oraz pracę z jej współautorstwem, pod tytułem w piśmie Laboratory Investigation (2015; 95, 133A-133A). Należy podkreślić, że tematyka cytowanych powyżej prac wykracza poza zagadnienia związane z rakiem nadnercza i dotyczy między innymi efektów działania mitotanu na linie komórkowe komórek raka piersi, płuc, czy jelita grubego.

W podsumowaniu, prezentowana rozprawa doktorska wnosi istotny wkład do badań nad leczeniem raka kory nadnercza, zaś uzyskane wyniki są oryginalne oraz mogą mieć w przyszłości zastosowanie kliniczne. Doktorantka wykazała się niezwykłą pracowitością doskonałą znajomością omawianej tematyki oraz wykorzystwała w pracy najnowszą metodologię badań naukowych. Na gruncie polskim, gdzie jak wspomniałem na wstępie, diagnostyka i leczenie szeregu chorób nadnerczy pozostawia wiele do życzenia, praca ta jest absolutnie nowatorska. Przegląd dostępnych publikacji świadczy także, że Doktorantka uczestniczy w szeregu programach badawczych związanych oceną działania szeregu substancji na komórki nowotworowe, również w innych nowotworach niż rak kory nadnercza. Dodatkowo recenzowana praca jest przykładem owocnej międzynarodowej współpracy naukowej z wykorzystaniem funduszy Unii Europejskiej (grant POMOST),

co przyczynia się do rozwoju nauki polskiej oraz prowadzenia badań, co do których można stwierdzić, że istotnie stanowią one *"the cutting edge of clinical science"*. Należy także podkreślić, że ośrodek naukowy, w którym pracowała Doktorantka, jest jednym z wiodących światowych ośrodków endokrynologicznych, zarówno pod względem nauk podstawowych, jak i klinicznych.

Przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi rozprawy doktorskiej, określonych w artykule 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. 2003.65.595). W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie Pani magister Pauliny Szyszko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na nowatorski charakter pracy wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Profesor dr hab. n. med.
Krzysztof Lewandowski
Członek Królewskiego
Kolegium Lekarskiego Wielkiej Brytanii
specjalista chorób wewnętrznych,
endokrynologii i diabetologii
1630320

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Lewandowski