Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

prof. dr hab. Małgorzata Kajta
Pracownia Neuroendokrynologii Molekularnej
Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków
e-mail: kajta@if-pan.krakow.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Ewy Podgórskiej

„Wybrane aspekty działania witaminy D3 jako czynnika wspomagającego leczenie czerniaków"

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Ewy Podgórskiej została wykonana w Pracowni Radiospektroskopii Nowotworów i Radiobiologii należącej do Zakładu Biofizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, a także w Zakładzie Dermatologii, the University of Alabama, Birmigham, USA. Funkcję promotora w przewodzie doktorskim pełnili: prof. dr hab. Krystyna Urbańska oraz prof. dr hab. Andrzej Słomiński.

Badania stanowiące podstawę pracy doktorskiej zostały częściowo sfinansowane przez: Narodowe Centrum Nauki (grant kierowany przez prof. dr hab. Krystynę Urbańską), National Institutes of Health, USA (wsparcie badań kierowanych przez prof. dr hab. Andrzeja Słomińskiego), Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (wsparcie dla Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego KNOW; grant mgr Ewy Podgórskiej).

Rozprawa liczy 114 stron maszynopisu i zawiera następujące rozdziały: Wykaz Skrótów, Wstęp, Założenia i Cele Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję wraz z Podsumowaniem, a także Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim i Bibliografię. Spis piśmiennictwa zacytowanego w rozprawie zawiera 183 publikacje, głównie anglojęzyczne. Struktura pracy odpowiada w pełni obowiązującym standardom.

Doktorantka jest współautorką 4 publikacji, przy czym w 2 pracach oryginalnych (Podgórska i wsp. 2018, *Int J Mol Sci*, Podgórska i wsp. 2018, *Acta Biochim Pol*) pełni rolę pierwszego autora.

MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY

Przedłożona do recenzji praca stanowi próbę ustalenia, czy witamina D3 może być przydatna w skojarzonym leczeniu czerniaka błony naczyniowej oka. Według Autorki rozprawy, aby się o tym przekonać należy: i. Sprawdzić czy związki witaminy D3 tj. kalcytriol - $1,25(OH)_2D3$ i kalcydiol - 25(OH)D3, zwiększają wrażliwość komórek czerniaka skóry na promieniowanie jonizujące w postaci wiązki protonowej wytwarzanej przez cyklotron Proteus C-235; ii. Ustalić zależności między ekspresją receptora witaminy D3 w komórkach czerniaka skóry a wybranymi parametrami m.in. zdolnością tworzenia sferoidów (struktury 3D) i kolonii, tempem migracji i proliferacji komórek; iii. Ocenić zdolność komórek czerniaka błony naczyniowej oka do ekspresji receptora witaminy D3 tj. VDR; iv. Zweryfikować antyproliferacyjne właściwości związków witaminy D3 na wybranych liniach komórkowych czerniaka naczyniówki. W przedstawione przez Doktorantkę ZAŁOŻENIA i CELE PRACY wkradł się element niekonsekwencji; Autorka planuje na zmianę prowadzić badania na komórkach czerniaka skóry (punkty/pytania 1 i 3) względnie na komórkach czerniaka błony naczyniowej (punkty/pytania 2 i 4). Z czego wynika taki plan badań?

Czerniak błony naczyniowej jest uważany za najczęściej rozpoznawany u osób dorosłych pierwotny nowotwór oka/pierwotny guz wewnątrzgałkowy. Przerzuty pojawiają się aż u 50% pacjentów, ale na wczesnym etapie choroby są one diagnozowane zaledwie u niewielkiego odsetka przypadków. Przez wiele lat częstą procedurą terapeutyczną była enukleacja, która oprócz nieodwracalności interwencji chirurgicznej niosła ze sobą zwiększone ryzyko wystąpienia przerzutów. Wkrótce na znaczeniu zyskały radioterapia/brachyterapia, terapia laserowa i chirurgia oszczędzająca gałki oczne. Wśród innowacyjnych terapii wymienia się m.in. a) terapię nakierowaną na wątrobę (ang. *liver-directed approach*) będącą bardzo częstym miejscem przerzutów np. *isolated hepatic perfusion*, *hepatic intra-arterial chemotherapy*, *hepatic arterial chemoembolisation*; b) terapię celowaną blokującą ścieżki sygnałowe kinaz MEK, Akt i PKC; c) immunoterapię np. anty-CTLA-4; d) terapię anty-PD-1; e) połączoną blokadę CTLA-4 i PD-1; f) ingerencję w status epigenetyczny np. inhibitory HDAC.

Liczący 22 strony WSTĘP jest bardzo obszernym, a jednocześnie uporządkowanym wprowadzeniem w tematykę rozprawy. W tym rozdziale znajdziemy m.in. podstawowe informacje nt. 1. Witaminy D3, jej metabolizmu, aktywacji i inaktywacji; 2. Czerniaka skóry i czerniaka gałki ocznej; 3. Znaczenia witaminy D3 w kontekście nowotworów; 4. Terapii protonowej. Z lektury wynika, że Doktorantka dysponuje szeroką wiedzą na temat omawianych zagadnień, dzięki czemu z łatwością przeprowadza czytelnika przez gąszcz najnowszych danych z tej dziedziny nauki. Jasność przekazu wzmacnia 7 rycin ilustrujących: struktury chemiczne witaminy D3 i D2 oraz główne i pokrewne ścieżki metabolizmu witamy D3, działanie promieniowania słonecznego w skórze, odwrotną zależność między ekspresją VDR a stopniem złośliwości nowotworu, względną dawkę promieniowania dla protonów i fotonów i jej penetrację w głąb tkanki, jak również zestawienie liczby pacjentów poddanych terapii protonowej w latach 2007-2017. Doktorantka bardzo dokładnie analizuje podobieństwa i różnice między badanymi typami czerniaka. W tym rozdziale pracy brakuje mi jednak schematu porównującego czerniaka skóry z czerniakiem błony naczyniowej oka. Szkoda również, że Doktorantka nie scharakteryzowała pokrótce różnic w podejściu terapeutycznym do tych chorób.

Rozdział MATERIAŁY i METODY obejmuje łącznie 13 stron i zawiera: 1. Tabelę ze szczegółami dotyczącymi użytych odczynników; 2. Charakterystykę linii komórkowych, na których wykonano doświadczenia *in vitro*; 3. Opis materiału biologicznego pochodzącego od pacjentów, który wykorzystano do badań *ex vivo*; 4. Schemat podawania związków witaminy D3 do hodowli komórek; 5. Parametry terapii protonowej; 6. Szczegóły dotyczące prowadzenia hodowli komórek; 7. Procedurę napromieniania komórek wiązką protonów; 8. Informacje nt. tworzenia sferoidów i kolonii; 9. Opis pomiaru migracji i proliferacji komórek; 10. Opis wyciszania ekspresji VDR metodą CRISPR/Cas; 11. Opis pomiaru ekspresji białek metodą western blot oraz immunodetekcji; a także 12. Matematyczną i statystyczną analizę danych. Doktorantka bardzo skrupulatnie charakteryzuje m.in. hodowle komórkowe podkreślając, że dodawana do pożywki surowica była pozbawiona hormonów i/lub analogów witaminy D, co minimalizuje ryzyko uzyskania niemiarodajnych wyników i potwierdza bardzo dobre opanowanie przez Doktorantkę warsztatu badawczego. Dobrym dopełnieniem tego rozdziału byłyby schematy wykonanych przez Autorkę rozprawy doświadczeń z uwzględnieniem parametrów mierzonych w eksperymentach *in vitro* i *ex vivo*.

Kolejnym rozdziałem są WYNIKI opisane na 38 stronach i zilustrowane 37 wykresami, 1 schematem generowanego sgRNA, 1 zdjęciem komórek w mikroskopie świetlnym,

2 zdjęciami membran z western blot oraz 2 zdjęciami sferoidów komórek. Każdy podrozdział zawiera szczegółowy cel badawczy oraz zwięzły opis najistotniejszych wyników badań. Realizacja celów badawczych pozwoliła Doktorantce na uzyskanie oryginalnych wyników, spośród których za najważniejsze uważam wykazanie, że:

i. Kalcydiol użyty w nanomolowych stężeniach (10 i 100 nM) hamuje tempo proliferacji ludzkich i chomiczych komórek czerniaka (SKMel-188, BHM Ma, BHM Ab), a także w sposób zależny od stężenia zwiększa wrażliwość komórek czerniaka skóry na działanie wiązki protonowej;
ii. Wyciszenie ekspresji receptora VDR sprzyja proliferacji ludzkich komórek czerniaka skóry (WM164), a także osłabia hamujący wpływ witaminy D3 na proliferację tych komórek;
iii. Ekspresja receptora VDR jest odwrotnie skorelowana ze stopniem pigmentacji czerniaka błony naczyniowej w skrawkach pobranych od pacjentów;
iv. Linie ludzkich komórek czerniaka naczyniówki (Mel270, 92.1) wykazują ekspresję receptora VDR;
v. Pochodne witaminy D3, $1,20(OH)_2D3$ i 20(OH)D3, hamują proliferację ludzkich komórek czerniaka naczyniówki (Mel270); ale kalcydiol stymuluje proliferację tych komórek.

DYSKUSJA została przeprowadzona 13 stronach, z wyodrębnieniem 4 podrozdziałów nawiązujących bezpośrednio do celów pracy. Doktorantka z dużą swobodą, a chwilami wręcz ze swadą, przedstawia uzyskane przez siebie wyniki i poddaje je krytycznej analizie. To co dla niejednego młodego naukowca byłoby już znakomitym rezultatem, dla Doktorantki jest zaledwie wstępem do badań. Tak było m.in. podczas dyskusji efektów działania pochodnych witaminy D3 tj. $1,20(OH)_2D3$ i 20(OH)D3 wobec komórek czerniaka naczyniówki. Mimo iż wymienione substancje skutecznie hamowały proliferację komórek Mel270, to jednak nie wywoływały podobnego efektu w komórkach 92.1. Co więcej, kalcytriol nie działał, zaś kalcydiol stymulował proliferację komórek czerniaka, co zdaniem Doktorantki może rodzić kontrowersje odnośnie terapeutycznego potencjału witaminy D3 i jej pochodnych oraz wymaga dalszych badań. PODSUMOWANIE i WNIOSKI są w pełni uprawnione i oparte na oryginalnych wynikach. W Dyskusji zabrakło jednak odniesienia się Doktorantki do VDREs (ang. *vitamin D response elements*) oraz do receptorów RXR, które, jak o tym wspomina we Wstępie, tworzą dimery z receptorem VDR. Być może sposobem na oczekiwany efekt działania receptora VDR w terapii czerniaka mogłoby być regulowanie aktywności transkrypcyjnej

receptora na poziomie pozytywnych i negatywnych VDREs względnie poprzez zmiany ekspresji receptorów RXR.

Autorka rozprawy nie ustrzegła się drobnych błędów i nieścisłości, które przytaczam z obowiązku recenzenta: str. 7, wiersz 9 – „wpływ plejotropow", str. 8, wiersze 27 i 30 – „kalcidiol" i „kalcydiol"; nomenklatura wymaga ujednolicenia, str. 13, wiersz 30 – „za pomocą stężenia zwrotnego"; raczej chodzi o sprzężenie zwrotne, str. 16, wiersz 18 – „od kilku lat temu terapie", str. 35, wiersz 25 – „Wybrane linie komórkowe zostały wysiane", str. 36, wiersz 7 – „wybrane linie komórkowe w ilości 0,5 x 10^3/dołek zostały wysiane"; raczej wysiane zostały komórki, str. 36, wiersz 15 – „W zależności od linii komórkowej komórki zostały wysiane"; z lektury rozprawy wynika, że komórki były wysiewane i liczone w podobny sposób, niezależnie od linii komórkowej; str. 94, wiersz 8 – „w raz"; z kontekstu wynika, że powinno być wraz.

PODSUMOWANIE i WNIOSEK KOŃCOWY

Wprawdzie czerniak błony naczyniowej jest rzadko występującym, ale jednak bardzo agresywnym/inwazyjnym nowotworem oka. Obecnie wiele uwagi poświęca się zarówno wieloetapowemu procesowi onkogenezy/nowotworzenia, jak i poszukiwaniu skutecznych terapii czerniaka błony naczyniowej oka. Nadzieją klinicystów jest opracowanie terapii adjuwantowej, która skutecznie wesprze leczenie zasadnicze. W niniejszej pracy doktorskiej podobne znaczenie może mieć skojarzenie radioterapii protonowej z podaniem związków witaminy D3, co w założeniu ma zwiększyć efektywność terapii. W świetle przytoczonych danych, tematyka i cele badawcze przedstawionej do oceny pracy doktorskiej są adekwatne wobec wyzwań współczesnej nauki i medycyny. Wyniki podjętych przez Doktorantkę badań mają znaczenie nie tylko poznawcze, ale również potencjalnie kliniczne. Translacyjny aspekt przeprowadzonych badań został wzmocniony wykonaniem doświadczeń nie tylko na liniach zwierzęcych komórek czerniaka (BHM Ma, BHM Ab), lecz również na liniach ludzkich komórek czerniaka skóry (SkMel-188, WM164) i naczyniówki (Mel270, 92.1) oraz w oparciu o materiał biologiczny pobrany od pacjentów (tkanki wyłuszczonej gałki ocznej).

Rozprawę doktorską Pani mgr Ewy Podgórskiej oceniam bardzo wysoko. Podjęte przez Doktorantkę badania są oryginalne, nowatorskie i kompleksowe, a także mają dużą wartość translacyjną. Nieliczne uwagi krytyczne nie zmniejszają oceny merytorycznej ocenianej pracy. Zastosowanie przez Doktorantkę szeregu nowoczesnych metod i technik badawczych z obszaru biologii molekularnej i komórkowej oraz biofizyki istotnie przewyższa zwyczajowe wymogi

prac doktorskich, co skłania mnie do złożenia wniosku o wyróżnienie rozprawy. Rozprawa doktorska mgr Ewy Podgórskiej pt. „*Wybrane aspekty działania witaminy D3 jako czynnika wspomagającego leczenie czerniaków*" spełnia wymagania określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w zakresie Sztuki (Dz. Ustaw z 2003 r., Nr 65 poz. 595., Dz. Ustaw z 2005 r., Nr 164, poz. 1365, Dz. Ustaw z 2011 r., Nr 84, poz.455). Wnioskuję o dopuszczenie mgr Ewy Podgórskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 10 czerwca 2019 r. Małgorzata Kajta