

dr hab. n. med. Anna Mucha-Małecka, prof. NIO

Kraków, 09.12.2024 r.

Zakład Radioterapii

Narodowy Instytut Onkologii-Państwowy

Instytut Badawczy

ul. Garncarska 11

31-115 Kraków

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Bartosza Szymczaka pod tytułem: „Sygnalizacja purynergiczna w komórkach glejaka – badania in vitro nad mechanizmami patologicznymi i możliwościami terapeutycznymi”, wykonanej pod kierunkiem Promotor: dr hab. Katarzyny Roszek, prof. UMK oraz Promotor pomocniczej: dr Joanny Czarneckiej. Praca doktorska została zrealizowana w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Pani Dziekan, prof. dr hab. Justyny Rogalskiej z dnia 28.10.2024 roku, oparte na mocy uchwały nr 73 Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z dnia 25.10.2024 roku.

1. Formalna ocena układu rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Bartosza Szymczaka zawiera informację o finansowaniu przeprowadzonych badań, spis treści, wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały i metody, omówienie wyników, podsumowanie i wnioski oraz wykaz wybranych 69 pozycji piśmiennictwa. Następnie Autor umieścił cykl trzech publikacji naukowych, opublikowanych w 2023 i 2024 roku w zagranicznych czasopismach naukowych, takich jak: International Journal of Molecular Sciences, Cellular Signalling, BBA - Molecular Basis of Diseases. W skład cyklu wchodzi następujące publikacje:

1. Adinolfi, E., De Marchi, E., Grignolo, M., Szymczak, B., & Pegoraro, A. (2023). The P2X7 receptor in oncogenesis and metastatic dissemination: New insights on vesicular release and adenosinergic crosstalk. International Journal of Molecular Sciences, 24, 18, 13906. <https://doi.org/10.3390/ijms241813906>
2. Szymczak, B., Czarnecka, J., Czach, S., Nowak, W., & Roszek, K. (2023). Purinergic approach to effective glioma treatment with temozolomide reveals synergistic anti-cancer effects mediated by P2X7 receptor. Cellular Signalling, 106, 110641. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2023.110641>

3. Szymczak, B., Pegoraro, A., De Marchi, E., Grignolo, M., Maciejewski, B., Czarnecka, J., & Roszek, K. Retinoic acid-induced alterations enhance eATP-mediated anti-cancer effects in glioma cells: implications for P2X7 receptor variants as key players. Praca przyjęta do druku w BBA - Molecular Basis of Disease

Podkreślić należy, że wszystkie prace, składające się na cykl, zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o dużych wartościach współczynnika oddziaływania (IF - ang. *impact factor*) oraz punktacji MNiSW. Łączna wartość IF dla tych publikacji wynosi 13,5; a łączna liczba punktów MNiSW 380.

W dwóch publikacjach, składających się na cykl, będący podstawą rozprawy, Doktorant jest pierwszym autorem, a w jednej czwartym. Zgodnie z załączonym do rozprawy oświadczeniem o współautorstwie wkład w przygotowanie przez Doktoranta publikacji jest znaczący.

W pracy pierwszej Doktorant dokonał przeglądu literaturowego i uczestniczył w pisaniu oryginalnego manuskryptu. W pracy drugiej i trzeciej Autor opracował koncept badań, przygotował przegląd literaturowy, sporządził protokoły eksperymentalne, przeprowadził samodzielnie większość doświadczeń, wykonał analizę statystyczną wyników, wizualizację wyników oraz brał udział w pisaniu manuskryptu publikacji, jej edycji i odpowiedziach na recenzje. Opublikowane prace świadczą o dużym zaangażowaniu, samodzielności oraz dojrzałości naukowej Doktoranta.

Podsumowując formalną ocenę pracy doktorskiej mgr Bartosza Szymczaka stwierdzam, że praca ta została przygotowana zgodnie z normami przyjętymi dla tego typu opracowań.

2. Merytoryczna ocena pracy

Glejak wielopostaciowy (ang. glioblastoma multiforme, GBM) jest najbardziej agresywnym typem nowotworu występującym w ośrodkowym układzie nerwowym. Podstawowe metody jego leczenia to operacja z następową uzupełniającą radioterapią skojarzoną z temozolomidem (TMZ). Wyniki leczenia w tej grupie chorych są bardzo złe, 5-letnie wskaźniki przeżycia wahają się na poziomie 5-10%. Dlatego wybór tematyki pracy doktorskiej jest bardzo aktualny.

Głównym celem pracy doktorskiej było określenie, jakie zmiany w systemie sygnalizacji purynergicznego zachodzą w komórkach glejaka poddanych procesowi indukowanego różnicowania w kierunku neuralnym. Bardzo interesujące z punktu widzenia klinicysty są również szczegółowe cele postawione przez Doktoranta.

W publikacji pierwszej przedstawiono przegląd piśmiennictwa dotyczący znaczenia receptora P2X7 i jego ludzkich wariantów splicingowych w proliferacji nowotworów litych i płynnych, rozprzestrzenianiu się nowotworu oraz krzyżowaniu się z komórkami odpornościowymi. Szczególną uwagę poświęcono zależnemu od P2X7 uwalnianiu mikropęcherzyków i egzosomów, ich zawartości, w tym ATP (adenozynotrifosforan) i miRNA,

oraz mechanizmom aktywowanym przez P2X7 sprzyjającym rozprzestrzenianiu się przerzutów. Przedstawiono również nowe informacje na temat jego potencjału terapeutycznego. Przedstawione doniesienia literaturowe wyraźnie sugerują, że receptor P2X7 jest odpowiednim celem terapeutycznym w schorzeniach onkologicznych. W zależności od rodzaju nowotworu, wariantów i kontekstu adenozynergicznego, P2X7 może być wykorzystany do opracowania nowych strategii terapeutycznych.

W drugiej pracy Doktorant zbadał interakcje receptora P2X7 z temozolomidem (TMZ) na linii komórkowej ludzkiego glejaka. Zastosowano wstępne różnicowanie komórek glejaka A172 indukowane kwasem retinowym (RA) i zbadano ekspresję receptora P2X7 w niezróżnicowanych i zróżnicowanych glejakach. Porównano wpływ agonistów/antagonistów receptora P2X7 i ich współdziałanie z TMZ w obu typach komórek poprzez ocenę proliferacji komórek, ich żywotności i właściwości migracyjnych. Zróżnicowane komórki glejaka okazały się bardziej podatne na działanie samego ATP i TMZ, ale także na skojarzone działanie TMZ i ATP. Równoczesne zastosowanie ATP i TMZ zmniejsza o 70% żywotność i zdolność migracji zróżnicowanych komórek glejaka A172. Wykazano, że wyniki te można osiągnąć już przy niskim nietoksycznym stężeniu ATP i przy zmniejszonym do 125 μM skutecznym stężeniu TMZ. Cząsteczki ATP muszą być obecne i utrzymywane w odpowiednim stężeniu w mikrośrodowisku komórek glejaka, aby osiągnąć ich współdziałanie z TMZ i zwiększoną aktywność przeciwnowotworową. Wszystko to z kolei może skrócić terapię, zwiększyć jej skuteczność i ograniczyć skutki uboczne dla pacjenta. Uzyskane wyniki stwarzają obiecującą perspektywę dla rozwoju nowych skojarzonych terapii onkologicznych.

W trzeciej pracy celem było wspieranie zmian indukowanych przez kwas retinowy (RA) w komórkach glejaka za pomocą zewnątrzkomórkowego ATP. Przeprowadzone przez Doktoranta badania koncentrowały się na określeniu dynamiki sygnalizacji purynergicznej dwóch różnych ludzkich linii komórkowych glejaka M059K i M059J poddanych protokołowi różnicowania opartemu na RA. Zastosowana procedura spowodowała znaczną modulację ekspresji wariantów receptora P2X7 na poziomie genów i białek oraz zmniejszenie aktywności ekto-nukleotydazy. Łącznie prowadziło to do zmniejszenia tempa proliferacji i migracji komórek, a także zwiększonej wrażliwości na cytotoksyczny wpływ eATP. Doktorant potwierdził, że mikromolarne stężenia ATP zmniejszyły żywotność komórek odpowiednio o 40% i 20% w komórkach M059K i M059J traktowanych RA. Ponadto zaobserwowano spadek zdolności migracji do 60% w obecności 100 μM ATP. Podsumowując stwierdzono, że zmiany indukowane kwasem retinowym w połączeniu z mikromolarnym eATP mogą być skuteczne jako terapia przeciwnowotworowa wpływająca na sygnalizację purynergiczną.

Wszystkie cele badawcze zostały zrealizowane. W rozdziale „Podsumowanie i Wnioski” przedstawiono zwięzłe podsumowanie wynikające z przeprowadzonych badań. Dla klinicystów istotne jest, że przeprowadzone w niniejszej pracy badania rozszerzają wiedzę na temat zmian zachodzących w komórkach glejaka pod wpływem indukowanego różnicowania w kierunku neuralnym i zwracają uwagę na zmiany zachodzące w systemie sygnalizacji

purynergiczej. Wyniki wskazują, że różnicowanie kwasem retinowym w połączeniu z kontrolą sygnalizacji purynergiczej w mikrośrodowisku nowotworu posiadają potencjał jako terapia wspierająca do obecnie stosowanych kuracji przeciwnowotworowych. Dodatkowo, możliwość wpływania na poziom ekspresji izoform receptora P2X7 i jego warunkowa oraz miejscowo specyficzna aktywacja jest obiecującym celem terapeutycznym.

Rozprawa jest pracą wyróżniającą się, porusza istotny dla klinicystów temat. Nowe możliwości terapeutyczne glejaka wielopostaciowego przedstawione w pracy mogą przyczynić się do poprawy wyników leczenia tego bardzo agresywnego nowotworu.

Autor wykazał się odpowiednią wiedzą teoretyczną i nabył umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych, czego efektem są trzy publikacje w renomowanych czasopismach naukowych.

W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, wniosek o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje również o wyróżnienie pracy.

Z poważaniem