

**Recenzja rozprawy
na stopień doktora nauk medycznych
lek. Piotra Kuliga
pt "Epigenetyczne aspekty mechanizmu działania bortezomibu, mechanizmów rozwoju
lekooporności oraz implikacje kliniczne dla rozwoju potencjalnych terapii
adjuwantowych"**

Zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie z dnia 30.01.2024r, o powołaniu mnie na recenzenta w/w rozprawy mam zaszczyt przedstawić swoją opinię.

1. Wartość celu badawczego

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska dotyczy ważnego problemu medycznego jakim są epigenetyczne aspekty mechanizmu działania bortezomibu (BTZ), molekularne mechanizmy prowadzące do rozwoju lekooporności na inhibitory proteasomu oraz poszukiwanie potencjalnych możliwości zwiększenia skuteczności przeciw szpiczakowej tego leku u chorych na szpiczaka plazmocytoowego (MM). Proteasom jest kompleksem enzymów proteolitycznych, którego podstawową funkcją jest degradacja białek związanych z ubikwityną. Substratami dla proteasomu są m.in. mediatory szlaków metabolicznych, które w klonalnych plazmocytach są zaburzone. Zablokowanie proteasomu upośledza aktywność jądrowego czynnika transkrypcyjnego i prowadzi do apoptozy komórek. Uwaga badaczy skupia się obecnie na analizie modyfikacji epigenetycznych m.in. zmian w metylomie oraz badaniu tzw niekodującego RNA, które z jednej strony wpływają na cytotoksyczne właściwości leku, ale z drugiej strony sprzyjają wystąpieniu oporności na ten lek. Pierwszym inhibitorem proteasomu zastosowanym w terapii chorych na szpiczaka plazmocytoowego był bortezomib. Wg Durie zastosowanie bortezomibu było kamieniem milowym w leczeniu chorych na szpiczaka plazmocytoowego i zmieniło paradygmat leczenia tej choroby. Badania wykazały bowiem, że bortezomib wykazuje silne działanie hamujące, nawet w opornych

liniach szpiczakowych, zwiększa aktywność przeciwnowotworową deksametazonu i przełamuje oporność komórek szpiczakowych m.in. na dokсорubicynę i melfalan.

Głównym celem przedstawionej mi do recenzji pracy było badanie modyfikacji epigenetycznych i modyfikacji histonów w aspekcie mechanizmów działania bortezomibu i rozwoju oporności na lek u chorych na szpiczaka plazmocytoowego. Doktorant otrzymał również za zadanie poszukiwanie sposobów terapii adjuwantowej mającej na celu przełamania tej oporności i wzmocnienie przeciwnowotworowego działania bortezomibu. Tak więc problemy i pytania postawione przez Doktoranta są klinicznie bardzo ważne, naukowo, u chorych na szpiczaka plazmocytoowego, niedostatecznie opracowane.

2. Poprawność metodyczna

Doktorant przeprowadził dwa eksperymenty *in vitro*. Do badania wykorzystano komórki MM linii U266, które były inkubowane w odpowiednim medium z bortezomibem w stężeniu 2,75 nM, oraz inhibitorem metylacji 5-Aza-2-deoksycytydyną (AZA) w stężeniu 1 μ M. Przeprowadzono izolacje DNA oraz analizę proliferacji po każdej inkubacji komórek z bortezomibem i/lub azacytydyną. Badano rozwój oporności na bortezomib i wpływ azacytydyny na potencjał proliferacyjny komórek szpiczaka.

Dodatkowo sprawdzano, czy potencjalnie powstałe zmiany epigenetyczne są przekazywane komórkom potomnym. W tym celu wyizolowano DNA z komórek pasażowanych, do medium pozbawionego bortezomibu i azacytydyny. Przeprowadzono izolację DNA i analizę mikromacierzy metylacji. Zwieńczeniem eksperymentu była analiza bioinformatyczna.

W drugim eksperymencie zastosowano komórki tej samej linii. Na potrzeby badania wyłoniono 4 podgrupy: D, BTZ, DK, BTZ-DK w których stosowano odpowiednio: (1) vit D3, (2) bortezomib, (3) vit D3 i vit K2 równocześnie, oraz (4) bortezomib, vit D3 i vit K2 równocześnie

Zastosowane metody są nowoczesne, prawidłowo zaprogramowane i obejmują swym zakresem postawione przez Doktoranta cele pracy. Jakość wykonanych oznaczeń jest satysfakcjonująca, obrazuje ogrom wykonanej pracy i wskazuje na bardzo wysoki standard warsztatu badawczego, w którym praca ta powstała.

Analiza uzyskanych wyników jest wszechstronna, wnikliwa i daje odpowiedź na problemy ujęte w celach pracy.

3. Znaczenie naukowe i praktyczne wniosków wynikających z przeprowadzonych badań

W wyniku przeprowadzonych badań Doktorant dowiódł, że po trzecim pasażu komórki linii szpiczakowej inkubowane z BTZ stały się odporne na lek, a ich aktywność proliferacyjna była podobna jak komórek linii U266. Ponadto wykazano, że odporne na BTZ komórki linii szpiczakowej w środowisku BTZ i AZA wyraźnie zmniejszały proliferację wraz ze zwiększeniem dawki AZA, przy czym najmniejszy poziom proliferacji występował przy zastosowaniu najwyższej dawki AZA. Trzykrotne inkubowanie komórek szpiczaka z AZA zmniejszało proliferację komórek opornych na BTZ o około 72%. Analizę profilu metylacji przeprowadzono po drugim i trzecim oraz 10 dni po trzeciej inkubacji komórek U266 z BTZ. Doktorant, dzięki analizie bioinformatycznej udowodnił po drugim i trzecim pasażu, odpowiednio 301 miejsc i 2996 miejsc ze zmienioną metylacją w komórkach wcześniej inkubowanych BTZ i inhibitorem metylacji, w porównaniu z komórkami pasażowanymi wyłącznie BTZ. Eksperyment wykazał również, że po drugim i trzecim pasażu komórek MM z BTZ i AZA występują różnice w zakresie wzorca metylacji genu *ORA13*, którego nadmierna ekspresja jest związana z opornością na chemioterapię. Istotną klinicznie wydaje się obserwacja dotycząca różnic w statusie metylacji genu *MIR21* związanego z opornością na leczenie w niektórych nowotworach litych. Zaobserwowane zmiany mogą w istotny sposób indukować oporność na bortezomib.

Ponadto eksperyment przeprowadzony przez Doktoranta wykazał, że zmiany w metylacji DNA są trwałe i przekazywane do komórek potomnych. Z punktu widzenia klinicysty jest to bardzo ważna informacja, która może przełożyć się bezpośrednio na opracowanie strategii leczenia chorego na MM. Analiza bioinformatyczna przeprowadzona po 10 dniach po trzecim pasażowaniu BTZ i AZA wykazała niewielkie różnice w porównaniu do wyników uzyskanych po trzecim pasażowaniu.

W kolejnym eksperymencie Doktorant wykazał, że w komórkach linii szpiczakowej wrażliwych na bortezomib, vit D i vit K wykazywały działanie synergistyczne z inhibitorem proteasomu. Zarówno vit. D jak i vit. K, ze względu na udokumentowane działania immunomodulujące, mogą mieć niekwestionowane znaczenie w terapii adjuwantowej guzów litych i nowotworów hematologicznych, stąd włączenie tych witamin do eksperymentu było uzasadnione i poszerzyło naszą wiedzę dotyczącą możliwości zwalczania oporności na BTZ. Eksperyment wykazał, że po dodaniu witamin do medium hodowlanego uzyskiwano zmniejszenie proliferacji komórek MM U 266 opornych na bortezomib. Bardzo cenna obserwacja dotyczy faktu, że suplementacja vit D i vit K zwiększa metylację w komórkach

szpiczaka zarówno kontrolnych jak i opornych na BTZ, inkubowanych z wit D lub w połączeniu wit D z wit K. Może to oznaczać, że komórki odporne na BTZ hodowane w medium wzbogaconym wit D i wit K. mogą odzyskać wrażliwość na inhibitor proteasomu. Ponadto w eksperymencie zostały zidentyfikowane geny związane z onkogenezą i progresją nowotworów, o istotnie zmienionych poziomach metylacji np. genów *NTN1* i *MYH10*. Ciekawa obserwacja dotyczy genu *CLC12B*, którego niska ekspresja jest związana z progresją nowotworu. Doktorant wykazał, że w komórkach szpiczaka zarówno kontrolnych jak i opornych na BTZ ekspresja tego genu jest mniejsza w porównaniu do komórek inkubowanych z wit D i wit K.

4. Redakcja pracy

Przedłożona mi do oceny rozprawa na stopień doktora nauk medycznych składa się z cyklu monotematycznych prac, w których w Doktorant jest pierwszym autorem (publikacja 1), lub równorzędnym pierwszym autorem (publikacja 2 i 3). Na cykl prac składa się jedna praca pogładowa i 2 prace oryginalne, wszystkie prace w języku angielskim. Są to:

1. Kulig P, Łuczowska K, Bakinowska E, Baumert B, Machaliński B.: Epigenetic Alterations as Vital Aspects of Bortezomib Molecular Action. *Cancers* 2024, 16,84, **IF 5,2; MEiN 200.**
2. Łuczowska K*, Kulig P*, Rusińska K, Baumert B, Machaliński B.: 5-Aza-2'-Deoxycytidine Alters the Methylation Profile of Bortezomib-Resistant U266 Multiple Myeloma Cells and Affects Their Proliferative Potential. *Int. J. Mol. Sci*, 2023, 24, 16780. **IF 5,6; MEN 140 pkt.**
3. Łuczowska K*, Kulig P*, Baumert B, Machaliński B.: Vitamin D and K Supplementation Is Associated with Changes in the Methylation Profile of U266-Multiple Myeloma Cells. Influencing the Proliferative Potential and Resistance to Bortezomib. *Nutrients* 2024, 16, 142, **IF 5,9; MEiN 140 pkt.**

Łączna punktacja prac włączonych do cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską wynosi 480 pkt MEiN; łączny IF:16,7.

Do cyklu publikacji Autor zamieścił krótkie streszczenie przeprowadzonych badań, które zawiera Wstęp, Cel pracy, Metodologię, Wyniki, Dyskusję i Wnioski.

W dyskusjach zamieszczonych w opublikowanych pracach lekarz Piotr Kulig wszechstronnie omawia wyniki swoich badań w odniesieniu do prac innych autorów zajmujących się podobnymi problemami badawczymi. Autor wykazał się krytycyzmem i

znakomitą znajomością problemów dotyczących epigenetycznych aspektów mechanizmu działania bortezomibu, mechanizmów rozwoju lekooporności i możliwości zastosowania potencjalnych terapii adjuwantowych. Rozprawa doktorska lekarza Piotra Kuliga jest naturalną konsekwencją badań tych problemów w chorobach rozrostowych krwi i układu chłonnego. O doświadczeniach ośrodka i Badacza świadczą prace dotyczące tych zagadnień opublikowane w renomowanych czasopismach międzynarodowych takich jak *Nutrients* 2023; *Scientific Reports* 2021; *International Journal of Molecular Sciences* 2022; *Leukaemia Lymphoma* 2021; *Sciences Report* 202; *Cancers* 2023.

Wnioski wynikają z wykonanych badań, są w pełni uzasadnione i klinicznie ważne. Autor cytuje prace polskiego i angielskojęzycznych autorów, z uwzględnieniem najnowszego piśmiennictwa.

W załączonym streszczeniu przedstawionym jako omówienie cyklu publikacji jest wiele błędów edycyjnych, gramatycznych, zdań będących „kalką” języka angielskiego. Wprawdzie streszczenie to, nie jest elementem Rozprawy Doktorskiej, jednak ponieważ zostało załączone zwróciłam uwagę na te nieprawidłowości.

Autor załączył oświadczenia współautorów o ich udziale w przedstawionych pracach. W mojej ocenie oświadczenie pierwszej Autorki publikacji nr 2 i nr 3 winno być sformułowane w sposób nie budzący wątpliwości, że Doktorant ma równorzędny wkład w powstałe publikacje, tzn: wkład pierwszej Autorki polegał na wspólnym z doktorantem opracowaniu metodologii, współuczestniczeniu w analizie formalnej, wspólnym pisaniu manuskryptu i wspólnym przygotowaniu rycin oraz pozyskaniu funduszy.

Wniosek końcowy

Oceniając rozprawę doktorską Piotra Kuliga pragnę stwierdzić, że nie mam żadnych zastrzeżeń merytorycznych odnośnie założeń, celu podjętych badań i zastosowanych metod badawczych. Uzyskane wyniki badań są interesujące, wartościowe, mogą implikować korzyści kliniczne, pozwalają na wysunięcie wniosków odpowiadających postawionym celom, wnoszą nowe informacje do wiedzy dotyczącej epigenetycznych aspektów mechanizmu działania bortezomibu, rozwoju lekooporności i możliwości zastosowania terapii adjuwantowych.

Przedstawiona do recenzji praca Lekarza Piotra Kuliga spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, ma charakter poznawczy i duże implikacje kliniczne. Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego

Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie wysoce pozytywną recenzję pracy, z wnioskiem o dopuszczenie Lekarza Piotra Kuliga do dalszych etapów postępowania doktorskiego.


Jednocześnie biorąc pod uwagę:

1. Wartość merytoryczną pracy
2. Nowoczesną metodykę badań
3. Ogromny wkład pracy włożony w wykonanie wszystkich oznaczeń i staranne opracowanie rozprawy
4. Umiejętność rozwiązywania trudnych problemów naukowych i przeprowadzenia krytycznej dyskusji własnych wyników badań w odniesieniu do piśmiennictwa.

Zgłaszam wniosek o wyróżnienie cum laude pracy.

Prof. dr hab. Lidia Usnarska-Zubkiewicz

Wrocław, 16. 03. 2024



Prof. dr hab. n. med. L. Usnarska-Zubkiewicz
Specjalista chorób wewnętrznych
Specjalista hematolog
Specjalista transplantolog
8474971