

Warszawa, dn. 29.08.2025 r.

dr hab. Katarzyna Wiktorska
katarzyna_wiktorska@sggw.edu.pl
tel. 22 593 25 68

Recenzja pracy doktorskiej mgr Marty Pelon pt.: „Rola gankyriny jako modulatora działania leków przeciwnowotworowych.”

w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Ogólna charakterystyka pracy

Praca doktorska przedłożona do recenzji została przygotowana pod kierunkiem promotorki – dr hab. Ireny Misiewicz-Krzemińskiej z Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie.

Celem pracy było wskazanie roli białka gankyriny w odpowiedzi na leczenie szpiczaka plazmocytozy lekami najczęściej stosowanymi w terapii przeciwszpiczakowej. Doktorantka podjęła bardzo ważny problem – poszukiwania nowych, skuteczniejszych możliwości terapii szpiczaka – i wskazała, że białko gankyrina może być pomocne jako marker różnicujący rokowania i schemat leczenia. Autorka zrealizowała cel pracy.

Szpiczak plazmocytozy, pomimo intensywnego rozwoju nowych opcji terapeutycznych, nadal pozostaje chorobą skracającą czas przeżycia pacjentów i charakteryzuje się wysokim ryzykiem nawrotu oraz rozwoju oporności na leczenie. Dlatego poszukiwanie nowych celów molekularnych, które poprawią efektywność leczenia, jest tematyką jak najbardziej aktualną i dostarczającą całkowicie nowej wiedzy naukowej. Ma również potencjał komercjalizacyjny, co stanowi dodatkową wartość badań. Ostatecznym celem jest poprawa życia pacjentów onkologicznych, co ma zarówno wymiar ekonomiczny, jak i społeczny.

Metodyka, jaka została wykorzystana do osiągnięcia celu i weryfikacji hipotez badawczych, obejmuje najnowsze techniki biologii molekularnej. Autorka przeprowadziła szereg badań – zarówno *in vitro*, w wyprowadzonych przez siebie modelach komórek o różnym stopniu obniżenia ekspresji gankyriny, co pozwoliło jej wykazać wpływ tego białka na status molekularny i

funkcjonowanie komórek, jak również na cytotoksyczność leków stosowanych w terapii, ze szczególnym uwzględnieniem leków z grup inhibitorów proteasomu. Badania te skonfrontowała z analizą odpowiedzi pacjentów na różne schematy leczenia z wykorzystaniem powyższych leków w zależności od poziomu gankyriny. Badania uzupełnia wskazanie szlaków sygnałowych, które są regulowane przez gankyrinę.

Zebrane wyniki pozwoliły wykazać, że gankyrina jest zaangażowana w regulację aktywności proteasomu i że szczególnie w przypadku jego inhibitora – bortezomibu – odpowiedź na leczenie jest związana z wyjściowym poziomem tego białka. To najważniejsze osiągnięcie pracy, o bardzo istotnych implikacjach dla praktyki klinicznej. Przedłożona praca jest zatem oryginalnym rozwiązaniem problemu, jakim jest poszukiwanie nowych celów molekularnych w celu zwiększenia efektywności terapii szpiczaka plazmocytowego, a więc obszaru innowacyjnego i nowatorskiego, mogącego zrewolucjonizować terapie tego nowotworu, ale także innych, w których badane białko jako cel molekularny odgrywa istotną rolę.

Ocena metodologiczna rozprawy doktorskiej

Praca doktorska pani mgr Marty Pelon ma 112 stron, jest podzielona na 10 rozdziałów, ma układ typowy dla tego typu opracowań. Pracę rozpoczynają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis słów kluczowych, a kończy wykaz ilustracji i tabel. Rozdział pierwszy to część literaturowa zajmująca 14 stron. Tu zabrakło mi ilustracji, które w dobry sposób pomagają zrozumieć podstawy teoretyczne (np. w rozdz. 2.1 „Proteasom – budowa i funkcje”, czy rozdz. 5 – „Białko gankyrina”). Jest to moje subiektywne odczucie, które nie dyskredytuje wartości merytorycznej tego rozdziału. Następny rozdział „Cel pracy” przedstawia hipotezę badawczą, określa cel pracy i cele szczegółowe oraz je uzasadnia. Część doświadczalna dzieli się na trzy części – kolejno Materiały, Metody i Wyniki, które zajmują największą część pracy (40 stron). Pracę kończą, ujęte jako trzy odrębne rozdziały: Podsumowanie wyników, będące tabelarycznym zestawieniem najważniejszych zmian uzyskanych przez wyłączenie ekspresji PSMD10, kodującego białko gankyrinę; Dyskusja, będąca obszernym rozdziałem konfrontującym uzyskane wyniki z aktualnym stanem wiedzy i wynikami innych badaczy; oraz Wnioski, będące syntetycznym zbiorem najważniejszych osiągnięć pracy i potwierdzeniem osiągnięcia celu pracy. Ostatni rozdział to Bibliografia, która obejmuje 88 pozycji literaturowych. Analiza zebranego piśmiennictwa pozwala stwierdzić, że są to prace aktualne, w zdecydowanej liczbie z ostatnich pięciu–dziesięciu lat.

Na krytykę zasługuje dość niestaranne przygotowanie całej pracy. Sporo w niej błędów edytorskich (np. str. 8 – „plazmocytowym(MM)”); str. 10 – ADCP – brak nazwy w języku polskim; przecinki w różnych kolorach, brakujące spacje, a nawet urwane, niedokończone rozdziały – np. V 3.2). Zauważyłam też, że niektóre wykresy są pozostawione w języku angielskim, inne w polskim. Odnosniki literaturowe są formatowane w różny sposób. Można też znaleźć kolokwializmy, które nie powinny wystąpić w pracy na tym etapie rozwoju naukowego (np. „absorbancję przy komórkach kontrolnych przyjęto za 100% proliferacji” – str. 45, „szybszy czas proliferacji” – str. 59). W opisie wyników stosowane jest do grafik raz określenie „Wykres”, a raz „Rycina”. Na czym polega różnica? Ogólne wrażenie pośpiechu w przygotowaniu pracy znakomicie rekompensuje dyskusja, która jest najmocniejszym elementem pracy – zarówno pod względem merytorycznym, jak i edytorskim. Wygląda na to, że doktorantka najlepiej czuje się w analizie wyników, co zasługuje oczywiście na uznanie – to kwintesencja pracy naukowca, jednakże staranne wprowadzenie oraz estetyka języka i pracy są też istotną częścią opracowania.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Część literaturowa to skompresowane wprowadzenie do tematyki badań. Przegląd najnowszej literatury obejmuje specyfikę szpiczaka plazmocytoowego, sposoby leczenia i mechanizmy działania poszczególnych leków, z uwzględnieniem w szczególności inhibitorów proteasomu. Następnie omówione zostało znaczenie i funkcje proteasomu, aby na końcu dotrzeć do bohaterki pracy – gankyriny. Opisano szczegółowo mechanizmy onkogenne, w które zaangażowana jest gankyrina (w szczególności udział w regulacji supresorów nowotworowych RB, P53 czy KEAP1), a także znaczenie tego białka dla rokowań w szpiczaku plazmocytoowym. Autorka stwierdza, że zatwierdzone leki na szpiczaka działają w oparciu o różne mechanizmy, z których nie wszystkie są poznane. Jest to fascynujący fakt i świetny punkt wyjścia do podjęcia tematyki zawartej w doktoracie. W ten sposób część literaturowa jest kompletnym uzasadnieniem obranego przez autorkę celu pracy.

Następnie autorka przechodzi do celu pracy, który razem z hipotezą i celami szczegółowymi dobrze pozwala ułożyć (śledzić) tok badań.

Część pracy opisująca materiały i metodykę zasługuje na uznanie – bardzo sumiennie i starannie wymieniono materiały wykorzystane w pracy wraz z charakterystyką linii komórkowych, co świadczy o dobrym rozeznaniu autorki w prowadzonych badaniach i jest transparentne. Podobny komentarz należy się metodyce, gdzie przedstawiono szczegółowo sposób prowadzenia badań wraz z kluczowymi parametrami i stężeniami odczynników. Jedynie w rozdziale 3.4, opisującym test na aktywność proteasomu, zabrakło opisu parametrów, przy których prowadzone były badania.

Autorka zastosowała szerokie spektrum metod biologii molekularnej, jak również metod *in vitro*. Oceniam, że metody zostały dobrze dobrane, co pozwoliło na uzyskanie wiarygodnych, komplementarnych wyników umożliwiających analizę. Wskazuje to na samodzielność doktorantki i dobre opanowanie warsztatu pracy. Należy wysoko ocenić uzyskanie linii z różnymi poziomami białka, co doskonale pozwoliło porównać i ocenić jego znaczenie w leczeniu różnymi lekami, a co za tym idzie – jego znaczenie dla terapii. Doskonałym uzupełnieniem była analiza statystyczna danych, wymagająca dodatkowej wiedzy, co wskazuje na wszechstronność badaczki.

Opis wyników rozpoczyna się od opisu wyprowadzenia modeli genetycznych (ze zróżnicowanym poziomem gankyriny). Charakterystyka otrzymanych linii (klonów) została w mojej ocenie przeprowadzona dokładnie i systematycznie. W tym miejscu zabrakło mi komentarza autorki, dlaczego i które linie wybrała do badań (np. dlaczego nie użyto linii H929, która również wykazywała wysoki poziom gankyriny, co autorka opisuje w rozdziale 1.1, oraz dlaczego wybrano linię JJN3 i U266 w rozdz. 1.2.2). Dodatkowym pytaniem jest, czy badana była nadekspresja gankyriny zgodnie z opisem metodyki (IV 1.14).

Następnie doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę wpływu zmiany poziomu badanego białka na parametry funkcji linii komórkowych *wild type* i ze zmienionym poziomem gankyriny – czas podwojenia populacji, tempo syntezy białek i aktywność proteasomu. Uzyskano szereg interesujących danych, w szczególności ciekawe i mogące stanowić trudność w interpretacji wyniki dla komórek o wysokim i niskim poziomie gankyriny, gdzie obniżenie (częściowe lub całkowite) poziomu białka prowadzi do odwrotnych reakcji komórki. Szczególnie ciekawe i konkluzyjne wyniki uzyskano w odniesieniu do aktywności proteasomu.

W następnej części autorka przedstawiła badania wpływu poziomu gankyriny na efektywność leków w podaniach pojedynczych i w kombinacjach. Zastosowano bardzo ciekawy model złożony z wyników badań prowadzonych z udziałem ludzi (baza COMPASS, badanie GEM-Claridex) oraz badań *in vitro* prowadzonych w wyprowadzonych wcześniej komórkach o zmienionym poziomie białka gankyriny. Ta część pracy dostarcza bardzo cennych danych i w mojej ocenie stanowi bogaty,

dobrze dobrany model badawczy. Pozwolił on uzyskać interesujące wyniki i wnioski. Analiza danych próbek pacjentów pozwoliła stwierdzić, że czas wolny od wznowy był dłuższy w przypadku niskiego poziomu gankyriny, szczególnie w przypadku terapii karfilzomibem i kombinowanej terapii lekami IMiD oraz bortezomibem. W przypadku braku stosowania inhibitorów proteasomu nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie, co potwierdza słuszność hipotezy o wpływie poziomu gankyriny na efektywność leków z grupy inhibitorów proteasomu. Badania *in vitro* w liniach o zmienionym poziomie gankyriny wykazały, że istotnie leki z grupy inhibitorów proteasomu mają inną efektywność w komórkach *wild type* i pozbawionych ekspresji gankyriny. Tu ponownie obserwowano ciekawą, odmienną zależność w komórkach o natywnie wysokim i niskim poziomie gankyriny. W przypadku leków z innych grup nie obserwowano tak istotnych zmian (poza panobinostatem). Ten rozdział kończy zestawienie wyników terapii kombinowanych w celu potwierdzenia lub nie obserwacji z badań klinicznych, wskazujących, że poziom gankyriny odgrywa najistotniejszą rolę w przypadku tego typu leczenia. Autorka przedstawiła wykresy przeżywalności komórek dla podań pojedynczych i w kombinacjach, tytułując je synergizmem. To budzi moją wątpliwość - czy na pewno jest to synergizm we wszystkich przypadkach? Do takiej oceny brakuje przeprowadzonej analizy statystycznej czy określenia indeksów CI (Combination Index) np. według metody Chou–Talalay, czy zastosowania innych metod stosowanych do oceny interakcji leków (określenie, czy jest to synergizm, addytywizm lub antagonizm). Autorka podjęła się analizy i wyciągnęła wniosek, jednak wartość tych wyników byłaby większa, gdyby zastosowano bardziej ilościowe, a nie jakościowe metody porównania efektów. Tu ponownie brakuje mi wytłumaczenia, dlaczego do badań wykorzystano nie wszystkie badane wcześniej linie. Dodatkowo, dopatrzyłam się braku opisu metod badania doubling time i testu t-Studenta.

Ostatnim rozdziałem jest opis mający na celu ocenę wpływu białka gankyriny na regulację ścieżek sygnałowych poprzez metodę sekwencjonowania RNA-seq. Uważam, że ten etap badań został właściwie zaprojektowany, a analiza – właściwie przeprowadzona. Wykorzystano trzy linie komórkowe o różnym początkowym poziomie gankyriny i porównano wyniki uzyskane po wyłączeniu ekspresji tego białka. Autorka przedstawiła szereg analiz, które pozwalają na wyciągnięcie wniosków wykazujących odmienne profile genetyczne klonów. Wytypowano geny, które ulegają tym samym zmianom, a analiza porównawcza genów, które ulegają zmianom w tym samym lub przeciwnym kierunku w trzech liniach, pozwoliła stwierdzić, że obserwowany wcześniej podział na dwie grupy po traktowaniu lekami jest widoczny i na poziomie ekspresji genów. Autorka podjęła się również próby odpowiedzi na pytanie, jakie ścieżki sygnałowe są modyfikowane przez gankyrinę, wskazała kluczowe procesy, lecz opis wyników w tym rozdziale jest niekompletny – rozdział kończy się urwanym zdaniem.

Następny rozdział - Podsumowanie wyników jest bardzo dobrym pomysłem, zważywszy na dużą liczbę danych i często odmienne efekty w zależności od linii komórkowych.

Najlepszą częścią pracy jest dyskusja, która pozwoliła uporządkować i podsumować uzyskane wyniki oraz skonfrontować je z wynikami innych badaczy, również w odniesieniu do innych typów nowotworów. Autorka wskazała na wpływ gankyriny na funkcjonowanie komórki i aktywność proteasomu oraz związek z odpowiedzią na jego inhibitor – bortezomib. W tym kontekście uzyskane wyniki są bardzo istotne i wskazują na nowe możliwości zastosowania potencjału gankyriny jako czynnika prognostycznego. W mojej ocenie cennym wnioskiem, jaki wyciągnęła autorka, jest zwrócenie uwagi na odmienną obserwację w zależności od modelu komórkowego i uzasadnienie tego sposobem edycji genów, co potwierdziła analizami innych grup badawczych. Podjęła również próbę wyjaśnienia, jakie białka mogą mieć szczególnie istotny wpływ na odmienną odpowiedź na bortezomib. Przeprowadzona dyskusja zrodziła wiele pytań, które mogą być impulsem do dalszych badań, a to jest bardzo cenne – rozbudzić ciekawość naukową na podstawie uzyskanych dotąd

wyników. Tę część pracy oceniam wysoko. Dodam, że pani Marta Pelon jest autorką jednej pracy opublikowanej w *Frontiers in Pharmacology* i wykonawcą w projekcie OPUS NCN.

Do najważniejszych osiągnięć pracy należy zaliczyć:

- wskazanie, że gankyrina wpływa w sposób istotny na parametry życiowe komórek (jak proliferacja czy synteza białek de novo)
- wykazanie że gankyrina wpływa na aktywność proteasomu oraz jest istotnym czynnikiem decydującym o powodzeniu leczenia bortezomibem (inhibitorem proteasomu)
- wykazanie, że wyjściowy poziom gankyriny powoduje odmienną odpowiedź komórki na leczenie co jest związane z zmianami w ekspresji genów, a co za tym idzie ścieżek sygnałowych (w szczególności związanych z UPR i stresem ER)

Lektura pracy nasunęła kilka pytań i uwag, które pozwolę sobie zestawić poniżej:

- Autorka kończy dyskusję stwierdzeniem, że gankyrina może stanowić czynnik prognostyczny, jak w tym świetle można interpretować wyniki uzyskane dla komórek z obniżonym (lub pozbawione) poziomem gankyriny jako rekomendacje do leczenia.
- prosiłabym też o odpowiedź na pytanie jak Autorka tłumaczy że brak gankyriny prowadzi do zwiększania aktywności proteasomu w liniach komórkowych RPMI i U266
- prosiłabym o dokończenie analizy opisanej w rozdziale 3.2
- czy wszędzie występował synergizm w analizie podań pojedynczych i kombinowanych leków w badaniach in vitro, jak można to lepiej zanalizować?
- jakie przesłanki decydowały o wyborze konkretnych linii komórkowych do kolejnych etapów badań

Konkluzja

Podsumowując, autorka zebrała duży materiał doświadczalny, a uzyskane wyniki dostarczają nowych danych na temat znaczenia gankyriny w leczeniu i biologii szpiczaka plazmocytozy i są niewątpliwie cennym przyczynkiem do rozwoju efektywnych terapii przeciwszpiczakowych. Poszerzają stan wiedzy w dyscyplinie nauk medycznych. Wyniki uzyskane w tej pracy posiadają znaczącą wartość naukową i poznawczą w zakresie badań nad biologią chłoniaków, charakterystyką i nowymi perspektywami dla gankyriny, również w kontekście stosowania jej jako markera i czynnika prognostycznego w planowaniu terapii w klinice.

Przedłożona rozprawa doktorska dowodzi, że Autorka posiada bardzo dobre rozeznanie w literaturze z zakresu nauk medycznych, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Uzyskane i opisane w pracy wyniki na temat roli gankyriny w terapii szpiczaka plazmocytycznego stanowią istotny wkład w rozwój aktualnego stanu wiedzy i oferują oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, które dodatkowo może znaleźć praktyczne zastosowanie. Biorąc pod uwagę powyższe, moja opinia o przedłożonej rozprawie jest jak najbardziej pozytywna. Poinadto, stwierdzam, że rozprawa pani Marty Pelon pt „Rola gankyriny jako modulatora działania leków przeciwnowotworowych.” spełnia wymagania stawiane w Ustawie z dnia 20 lipca 2018r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii wnioski o dopuszczenie mgr Marty Pelon do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Ustawa Wójtka