

Dr hab. Ewa Augustin

Katedra Technologii Leków i Biochemii
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska
ul. Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk
☎ : (058) 347 14 68
e-mail: ewa.augustin@pg.gda.pl



Gdańsk, dnia 25.01.2017

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Anny Pawlik

pt. *„Wpływ łącznego działania 4-hydroksytamoksyfenu i izotiocyanianów na estrogenozależne komórki nowotworu piersi”.*

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej podjęty został istotny problem podniesienia skuteczności chemioterapii stosowanej w leczeniu nowotworów piersi poprzez zastosowanie terapii łączącej dwa czynniki: lek, 4-hydroksytamoksyfen (4-OH-T) oraz związek uwrażliwiający komórki nowotworowe na działanie zastosowanego leku. W tym celu w pracy wykorzystano biologicznie czynne, występujące w roślinach kapustowatych izotiocyaniany: sulforafan i erucynę. Praca zrealizowana została w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego, pod kierunkiem Pani dr hab. Anny Herman-Antosiewicz, prof. UG.

Poprawa skuteczności leczenia chorób nowotworowych stanowi jedno z najważniejszych zadań współczesnej medycyny. Chemioterapia, obok interwencji chirurgicznej i radioterapii, należy do standardów leczenia. Niestety, ze względu na brak istotnych różnic biochemicznych pomiędzy komórką prawidłową, a zmienioną nowotworowo, większość stosowanych chemoterapeutyków jest toksyczna dla człowieka, a chemioterapia niesie ze sobą wiele działań niepożądanych i nie zawsze skutecznie zwalcza chorobę. Do poważnych skutków ubocznych związanych z leczeniem chemoterapeutykami należy m.in. pojawiająca się oporność na stosowane leki. Sposobem przezwyciężenia oporności komórek nowotworowych na stosowane leki może być podjęta przez Doktorantkę w ramach niniejszej pracy próba jednoczesnego zastosowania chemoterapeutyku i związków z grupy izotiocyanianów, które poprawiłyby skuteczność działania chemoterapeutyku. Jest to bardzo słuszne podejście badawcze, ponieważ z danych literaturowych wiadomo, iż wybrane przez Doktorantkę izotiocyaniany: sulforafan i erucyna działają chemoprewencyjnie na wszystkich etapach procesu kancerogenezy, a ponadto hamują działanie kinaz aktywujących szlaki proprzeżyciowe w komórkach nowotworowych, co przyczynia się do zmniejszenia

wrażliwości komórek guza na stosowane chemoterapeutyki oraz rozwoju oporności na leczenie.

Przedstawiona do oceny rozprawa, licząca 165 stron, posiada konstrukcję typową dla prac doktorskich i jest niezwykle starannie opracowana i zredagowana. Składa się z indeksu skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, celu pracy, materiałów i metod, omówienia wyników, dyskusji oraz wykazu piśmiennictwa.

Streszczenie w języku polskim i angielskim właściwie prezentuje najważniejsze zagadnienia poruszane w rozprawie.

We Wstępie Autorka logicznie i kompetentnie wprowadza czytelnika w problematykę rozprawy. Przedstawia epidemiologię nowotworu piersi oraz jego molekularną charakterystykę. Następnie omawia budowę i funkcje receptorów estrogenowych, przedstawia charakterystykę i mechanizm działania przeciwnowotworowego badanego leku 4-hydroksytamoksyfenu oraz dwóch izotiocyjanianów: sulforafanu i erucyny. Opisuje również mechanizmy oporności komórek raka piersi na tamoksyfen oraz skutki uboczne terapii z zastosowaniem tego leku. Zagadnienia poruszane w tej części rozprawy są bardzo ściśle związane z przedmiotem dysertacji i wprowadzają czytelnika w problemy, które zostały w niej podjęte. Ta część pracy ukazuje, iż Doktorantka doskonale orientuje się w poruszanych w pracy zagadnieniach, dobrze zna piśmiennictwo z tego zakresu i cytuje wyniki innych autorów w sposób obiektywny i wyważony.

Cel pracy został przez Doktorantkę bardzo zwięźle sformułowany, w postaci jednego zdania, a jednocześnie dobrze pokazuje, jakie zadanie badawcze Doktorantka przed sobą postawiła. Cel pracy dotyczył (tutaj cytuję) "weryfikacji hipotezy o współdziałaniu wybranych izotiocyjanianów (sulforafanu oraz erucyny) z 4-hydroksytamoksyfenem w indukcji śmierci estrogenozależnych komórek nowotworu piersi oraz charakterystyka mechanizmu współdziałania tych związków". Umiejętność tak jasno postawionego celu badawczego budzi moje uznanie.

W rozdziale Materiały Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała stosowane w pracy linie komórkowe raka piersi, biorąc pod uwagę status wybranych receptorów: estrogenowego ER, progesteronowego PgR, naskórkowego czynnika wzrostu HER2, jak i status genu *p53*.

W rozdziale Metody Autorka skrupulatnie i systematycznie opisała stosowane metody badawcze, uwzględniając cały szereg stosowanych technik biochemicznych i z zakresu biologii komórki, m.in. elektroforezę SDS-PAGE, Western blotting, mikroskopię fluorescencyjną, test przeżywalności komórek. Nie mam wątpliwości, że powtórzenie przez innych eksperymentatorów opisanych w tym rozdziale doświadczeń nie będzie powodowało żadnych trudności.

W kolejnym rozdziale Doktorantka w sposób przejrzysty i wyczerpująco opisała wyniki swoich badań ilustrując je 31 rycinami i zestawiając w 2 tabelach. Zwróciła moją uwagę

doskonała jakość rysunków, jak również fakt, iż większość doświadczeń została wykonana w 2-3 powtórzeniach, co umożliwiło statystyczną analizę wyników.

Omawianie kolejnych doświadczeń Doktorantka poprzedza krótkim wprowadzeniem teoretycznym, co w mojej opinii bardzo ułatwia czytelnikowi analizę wyników.

W pierwszym etapie badań Doktorantka wykazała różną wrażliwość komórek trzech estrogenozależnych nowotworów piersi: MCF-7, T47D i BT-474 na działanie 4-hydroksytamoksyfenu i badanych izotiocyjanianów, a następnie zbadała wpływ kombinacji tych związków na żywotność komórek badanych linii. Wykazała, że kombinacje badanych związków powodowały znacząco większe obniżenie żywotności komórek nowotworu piersi, niż same izotiocyjaniany czy metabolit tamoksyfenu, najslabiej w przypadku linii BT-474 (HER2+). Ponadto, metodą Chou-Talalaya, stosując program CalcuSyn określiła, iż współdziałanie badanych związków w kombinacji ma charakter synergistyczny.

W toku dalszej realizacji postawionego celu badań, Doktorantka zbadała wpływ kombinacji badanych związków na indukcję śmierci apoptotycznej. W tym celu techniką Western blotting przeprowadziła analizę degradacji polimerazy PARP, która w apoptozie degradowana jest przez kaspazy wykonawcze 3 i 7 do formy 89kDa i uznawana za wiarygodny marker tego rodzaju śmierci komórkowej. Uzyskane wyniki pokazały, iż kombinacja badanych związków powodowała wzmożoną degradację tej polimerazy w komórkach trzech badanych linii nowotworu piersi, najsilniejszą w przypadku zastosowania kombinacji sulforafanu i 4-hydroksytamoksyfenu. Na rysunku 7.6 str. 65 trudno jest się jednak dopatrzeć prążka świadczącego o degradacji PARP dla sulforafanu i 4-OH-T dla komórek MCF-7 i dla sulforafanu w komórkach T47D. Indukcję apoptozy przez badane związki w kombinacji i oddzielnie Doktorantka potwierdziła barwiąc przyżyciowo komórki nowotworu piersi bromkiem etydyny i oranżem akrydyny. Dodatkowo, oprócz zidentyfikowania komórek wczesno- i późnoapoptotycznych, wykazała indukcję pierwotnej i wtórnej nekrozy w komórkach badanych linii w przypadku kombinacji 4-hydroksytamoksyfenu i badanych izotiocyjanianów. W tym miejscu mam uwagę, iż zdjęcia spod mikroskopu fluorescencyjnego na rysunkach: 7.8A, B i C (str. 68, 69 i 70) powinny być nieco większe co ułatwiłoby czytelnikowi rozróżnienie komórek umierających na drodze wczesnej i późnej apoptozy, jak i pierwotnej i wtórnej nekrozy.

Biorąc pod uwagę dane literaturowe wskazujące, iż zarówno izotiocyjaniany, jak i 4-OH-T indukują apoptozę na drodze mitochondrialnej, Doktorantka postanowiła sprawdzić, czy apoptoza wywoływana przez kombinację badanych związków będzie przebiegała tym szlakiem. W tym celu techniką Western blotting zbadała wpływ badanych związków na poziom kluczowych białek zaangażowanych w mitochondrialną ścieżkę apoptozy, takich jak: Bcl-2 i surwiwina (inhibitory apoptozy) oraz Bax (białko proapoptotyczne) w komórkach 3 linii nowotworu piersi. Istotny spadek antyapoptotycznego białka Bcl-2 i surwiwiny oraz

podniesienie poziomu proapoptotycznego białka Bax odnotowano w przypadku kombinacji badanych związków w komórkach MCF-7 i T47D, najslabiej w komórkach BT-474.

Badając dalej mitochondrialną ścieżkę apoptozy, Doktorantka sprawdziła, czy w cytoplazmie komórek nowotworu piersi traktowanych badanymi kombinacjami związków dochodzi do akumulacji kropli lipidowych, w wyniku zaburzenia funkcji mitochondriów pod wpływem czynników stresogennych, m.in. stresu oksydacyjnego. Stosując marker do wykrywania kropli lipidowych, białko ADRP, wykazała istotny wzrost poziomu tego białka w komórkach MCF-7 i T47D traktowanych łącznym działaniem 4-hydroksytamoksyfenu i izotiocyjanianów (większy w przypadku kombinacji z sulforafanem) w porównaniu do działania badanych związków oddzielnie. Kombinacja 4-OH-T z erucyną dała lepsze efekty w przypadku linii BT-474.

Biorąc pod uwagę fakt, iż białko Bcl-2 odgrywa istotną rolę w procesie autofagii, hamując ten proces, a kombinacja badanych związków obniżała poziom tego białka w komórkach badanych linii nowotworu piersi, Doktorantka sprawdziła czy w tych komórkach dochodzi do wzmożenia procesu autofagii pod wpływem działania badanych związków, w kombinacji i oddzielnie. Mierząc poziom ekspresji form białka LC3 stwierdziła, że działanie łączne izotiocyjanianów i 4-hydroksytamoksyfenu powoduje nasilenie poziomu autofagii w komórkach badanych linii nowotworowych. Dodatkowo, stosując inhibitor autofagii – wortmaninę (inhibitor kinaz PI3), Doktorantka wykazała, że w komórkach MCF-7 i T47D autofagia pełni funkcję ochronną, a w komórkach BT-474 promowała ich przeżycie. Chciałabym w tym miejscu zapytać czy Doktorantka sprawdzała wpływ wortmaniny na proliferację komórek badanych linii nowotworu piersi? Sama wortmanina w zależności od zastosowanego stężenia może niezależnie od wpływu na autofagię hamować proliferację komórek.

W celu zbadania stopnia cytotoksyczności i nieodwracalności działania badanych związków w kombinacji i oddzielnie w stosunku do komórek nowotworu piersi, Doktorantka wykonała test przeżywalności komórek (clonogenic assay). Wykazała, spadek zdolności komórek MCF-7, T47D i BT-474 do tworzenia kolonii pod wpływem łącznego działania badanych związków w porównaniu do działania każdego z nich osobno. W przypadku tej ostatniej linii komórkowej, cytotoksyczny efekt działania kombinacji związków utrzymywał się pomimo wysokiego poziomu autofagii, co może sugerować, że po dłuższych czasach ekspozycji autofagia prowadzi do śmierci komórek.

Ważnym elementem niniejszej rozprawy było wyprowadzenie przez Doktorantkę linii komórkowych raka piersi MCF-7 i T47D opornych na 4-hydroksytamoksyfen oraz zbadanie poziomu białek mogących być przyczyną tej oporności takich jak: HER2, EGFR, Akt, p-Akt, ERK-1,2 oraz pERK1,2. Przedstawione na Rys. 7.24 wyniki świadczą o odmiennym mechanizmie nabycia oporności przez komórki badanych linii. Następnie Doktorantka

wykazała, że obie analizowane kombinacje związków skuteczniej obniżają żywotność komórek opornych na 4-OH-T w porównaniu do związków działających niezależnie.

Interesujące wyniki otrzymała Doktorantka badając wpływ kombinacji izotiocyjanianów i 4-hydroksytamoksyfenu na żywotność komórek MDA-MB-231, które nie wykazują ekspresji receptorów estrogenowych. W zależności od zastosowanego stężenia tamoksyfenu (0.5 oraz 5 μ M), uzyskała istotne obniżenie żywotności tych komórek w przypadku zastosowania kombinacji izotiocyjanianów i 4-OH-T w wyższym stężeniu, w porównaniu do ekspozycji komórek na związki działające oddzielnie. Niezwykle istotnym wynikiem z punktu widzenia terapii przeciwnowotworowych było wykazanie, że badane kombinacje wpływają w znikomym stopniu na żywotność komórek niezmienionych nowotworowo nabłonka gruczołu sutkowego MCF-710A.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka podsumowuje własne wyniki, przedstawiając je w szerszym kontekście aktualnych badań, przytaczając odpowiednio dobrane dane literaturowe. Jest to bardzo wartościowa i bardzo dobrze napisana część pracy. Autorka zachowała należyty krytycyzm jeżeli chodzi o interpretację własnych wyników. W rozdziale tym Autorka na stronie 112 pisze m.in. iż w zależności od zastosowanego stężenia antyestrogenu, może on indukować w komórkach nowotworowych zjawisko tzw. przerwanej apoptozy (aborted apoptosis). Chciałabym aby Doktorantka w trakcie publicznej obrony opowiedziała na czym ten proces polega, jakie są jego markery biochemiczne, morfologiczne, czy znany jest mechanizm molekularny.

Końcowe wnioski wynikające z pracy kończą dyskusję, aczkolwiek w mojej opinii powinny one stanowić samodzielny rozdział, co podkreśliłoby dodatkowo ich znaczenie, gdyż w tym miejscu się trochę gubią.

Obszerne piśmiennictwo obejmujące 312 pozycji jest aktualne, trafnie dobrane i przytoczone.

Szczegółowe uwagi recenzenta:

1. Rozprawa zawiera drobne błędy literowe, których nie będę przytaczać, a których trudno uniknąć w tak obszernej pracy.
2. Test klonogeniczności nazwałabym testem badania przeżywalności komórek.
3. W podpisie rysunków 7.8A, 7.8B i 7.8C należałoby podać zastosowane powiększenie mikroskopu.
4. Podpis pod rysunkami 7.21, 7.22 i 7.23 – kolejność słupków nie odpowiada podpisowi pod rysunkiem, co utrudnia analizę wyników.
5. Str. 106 – areszt komórek w fazie G2/M – dosłowne tłumaczenie z angielskiego cell arrest - w języku polskim to słowo ma jednak inne znaczenie. Proponowałabym zahamowanie komórek w fazie G2/M.
6. Str. 111 – zamiast w większym stężeniu, powinno być w wyższym stężeniu.

Powyższe uwagi mają głównie charakter korektorski lub redakcyjny i w żadnym stopniu nie wpływają na moją wysoką ocenę niniejszej rozprawy.

W podsumowaniu stwierdzam, że zaprezentowane w rozprawie doktorskiej przez panią Annę Pawlik wyniki są jednoznaczne, przekonujące i stoją na wysokim poziomie naukowym. Część z tych wyników została opublikowana w czasopiśmie z listy ISI: *European Journal of Nutrition* 2016, 55(3):1165-1180. Autorka dowiodła, że umie prowadzić interesujące badania naukowe stosując wiele technik badawczych. Praca doktorska poświęcona jest niezwykle aktualnym zagadnieniom związanym z terapią nowotworów. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę stanowią cenny wkład w badania dotyczące terapii nowotworów piersi, które są najczęstszym nowotworem złośliwym występującym u kobiet i drugą przyczyną zgonów pacjentek onkologicznych. Wskazują one jednoznacznie, iż zastosowanie kombinacji chemoterapeutyku (4-hydroksytamoksyfenu) i izotiocyanianów (sulforafanu i erucyny) zwiększa skuteczność ich przeciwnowotworowego działania w porównaniu do efektów wywoływanych przez sam chemoterapeutyk wobec estrogenozależnych komórek nowotworu piersi.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona rozprawa doktorska zawiera istotne elementy nowości naukowej i jednoznacznie spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wnoszę więc do Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Anny Pawlik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Augustyn