



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej

ul. Przybyszewskiego 49
60-355 Poznań

tel. 61 8 69 15 32

e-mail: mrybczyn@ump.edu.pl

Poznań, dnia 9.01.2017r.

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Pawlik
„Wpływ łącznego działania 4-hydroksytamoksyfenu i izotiocyjanianów na estrogenozależne komórki nowotworu piersi”,
wykonanej w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego
przedstawionej
Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej
i Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
na stopień doktora nauk medycznych, dyscyplina medycyna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Anny Pawlik wpisuje się w światową problematykę dotyczącą poznania jak również ingerencji w mechanizmy odpowiedzialne za proces nowotworzenia. Prowadzenie badań i poznanie na poziomie komórkowym i molekularnym tych zjawisk pozwala zarówno na określenie aspektów diagnostycznych jak i terapeutycznych poprzez poszukiwanie i wskazanie odpowiednich biomarkerów jak również makromolekuł docelowego oddziaływania, które są odpowiedzialne za adhezję i rozprzestrzenianie, wzrost, proliferację oraz przerzutowanie komórek nowotworowych.

Praca doktorska Pani mgr Anny Pawlik ma układ typowy dla rozpraw doktorskich z zamieszczoną na początku informacją o finansowaniu projektu przez Narodowe Centrum Nauki.

Formalna ocena rozprawy. Oceniana rozprawa doktorska zawiera 165 stron tekstu. Składa się z 9 numerowanych rozdziałów z podrozdziałami, wśród których znajdują się w następującej kolejności: Wykaz skrótów stosowanych w pracy (2 strony), Streszczenie (2 strony) Summary (2 strony), Wstęp (28 stron), Cel pracy (1 strona), Materiały (6 stron), Metody (8 stron), Wyniki (48 stron) oraz Dyskusja (31 stron). Praca nie zawiera wyodrębnionego rozdziału Wnioski, natomiast Doktorantka kończąc dyskusję wyników przedstawiła w punktach rezultaty swoich badań oraz pewne uogólnienia co można potraktować jako wnioski. W ostatnim rozdziale p.t. Literatura przedstawiono spis 312 wykorzystanych w dysertacji pozycji literaturowych. Wyniki zamieszczono w 2 tabelach oraz na 31 rycinach. Proszę poprawić numery w podpisie rycin, które w omawianiu wyników stosowano poprawnie. Pracę napisano starannie poprawnym językiem naukowym.

Mgr Anna Pawlik w 28 stronicowym Wstępie podkreśla znaczenie i konieczność podejmowania badań nad zahamowaniem rozwoju nowotworów piersi cytując polskie i światowe dane epidemiologiczne. Przedstawiając charakterystykę molekularną podtypów raka piersi zwraca uwagę na znaczenie w procesie leczenia przynależności do określonego typu lub podtypu. Dlatego tak istotne jest określenie typu histopatologicznego, poziomu ekspresji receptorów estrogenowych (ER α lub ER β) i progesteronowych, poziomu ekspresji receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (HER2) oraz stopnia proliferacji z wykorzystaniem wskaźnika proliferacji Ki67. Wszystkie kolejne podrozdziały wstępu precyzyjnie zaplanowane wskazują na głęboką wiedzę Doktorantki i umiejętność posługiwania się nią w celu przybliżenia do coraz bardziej skomplikowanego obrazu molekularnego udziału receptorów estrogenowych w klasycznej i nieklasycznej regulacji transkrypcji genów w komórkach raka piersi.

Doktorantka w kolejnym podrozdziale omawia działanie pozagenomowe receptorów estrogenowych w aktywacji wewnątrzkomórkowej kaskady sygnalizacyjnej.

Ponieważ praca doktorska dotyczy efektywności terapeutycznej tkankowo specyficznego działania selektywnego modulatora receptorów estrogenowych w estrogenozależnych komórkach raka piersi metabolitu tamoksyfenu 4-hydrokstamoksyfenu w kombinacji z wybranymi izotiocjaninami Autorka dysertacji w kolejnych podrozdziałach przedstawia mechanizm działania obu antyestrogenów oraz mechanizmy odpowiedzialne za indukcję oporności. Omówienie w kolejnym podrozdziale pracy mechanizmów chemoprewencyjnego i przeciwnowotworowego działania sulforafanu oraz erucyny podkreśla celowość i znaczenie podjęcia przedstawionych w dysertacji badań.

Badania miały na celu weryfikację hipotezy o współdziałaniu izotiocjanianów: sulforafanu i erucyny z 4- hydroksytamoksyfenem w indukcji śmierci estrogenozależnych komórek nowotworu piersi oraz wyjaśnienie mechanizmów zaangażowanych w to zjawisko. Koncepcję pracy oceniam wysoko.

Dla zrealizowania celu pracy badania przeprowadzono na komórkach nowotworu piersi o określonym fenotypie uwzględniając status wybranych receptorów: ER, PgR, HER2. Ponadto fragment badań dotyczących wpływu wybranych izotiocjanianów na proliferację komórek przeprowadzono na wyprowadzonych z linii MCF7 oraz T47D liniach komórek opornych na działanie 4-hydroksytamoksyfenu. Należy zwrócić uwagę, że komórki nowotworowe piersi wybranych linii charakteryzują również różnice na poziomie molekularnym ekspresji i funkcji określonych genów zaangażowanych w procesy proliferacji i szeroko pojętej odpowiedzi komórek na modulatory.

Wykonanie pracy nie budzi zastrzeżeń. Uzasadnione zastosowanie metod z zakresu biologii komórki pozwoliło na wybór określonych biomarkerów charakteryzujących przeżywalność komórek, indukcję mitochondrialnej drogi apoptozy, modulację procesu autofagii w estrogenozależnych komórkach raka piersi eksponowanych na izotiocjaniany , 4-hydroksytamoksyfen oraz związki zastosowane w kombinacji. Ponadto scharakteryzowano pod względem wybranych receptorów obie wyprowadzone przez Doktorantkę linie odporne na 4-hydroksytamoksyfen co miało istotne znaczenie w proponowanym odmiennym mechanizmie uwrażliwiania na 4-hydroksytamoksyfen przez izotiocjaniany komórek T47D 4-OH-TamR w stosunku do MCF7 4-OH-TamR

Pani mgr Anna Pawlik oceniając testem MTT żywotność komórek ustaliła wartości IC50 oraz wykazała najmniejszy wpływ izotiocjanianów jak również 4-hydroksytamoksyfenu na komórki BT-477 HER2+ w porównaniu do komórek linii MCF7 i T47D. Pozwoliło to na wybranie stężenia izotiocjanianu jak również antyestrogenu do oceny działania związków w kombinacji i wyznaczenia wartości indeksu kombinacji (CI) wskazującego na synergistyczne działanie badanych kombinacji w tych liniach komórkowych. Doktorantka obserwując zmiany wewnątrzkomórkowego poziomu białek antyapoptotycznych takich jak Bcl-2 i survivina oraz białka proapoptotycznego Bax i białka ADRP - markera stresu mitochondrialnego wykazała związek między obniżeniem żywotności komórek a indukcją apoptozy na drodze mitochondrialnej. Wyniki tych badań korelowały z przyżyciową oceną rodzaju śmierci komórek indukowaną związkami. Obserwowane antynowotworowe współdziałanie izotiocjanianów z 4-hydroksytamoksyfenem ma charakter trwały co wykazał obniżony potencjał proliferacyjny komórek traktowanych kombinacjami związków. W celu wyjaśnienia zaangażowania procesu autofagii w odpowiedź estrogenozależnych komórek nowotworu piersi na działanie kombinacji izotiocjanianów z 4-hydroksytamoksyfenem dokonano analizy poziomu białka LC3-II co potwierdziło wzmożoną indukcję autofagii. Ze względu na dualistyczny charakter procesu autofagii w celu określenia roli jaką pełni ten proces w komórkach raka piersi eksponowanych na działanie badanych związków i ich kombinacji, przeprowadzono test SRB w obecności lub bez wortmaniny która hamuje aktywność kinazy PI3K typu III zaangażowanej w tworzenie fagoforu. Analiza wyników łącznego działania związków wykazała nasilenie procesu autofagii komórek wszystkich linii, natomiast w przypadku komórek linii MCF-7 i T47D proces ten pełni funkcję ochronną.

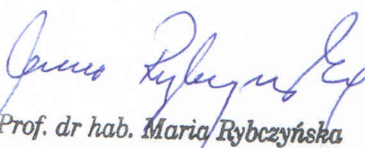
Interesujący oraz posiadający w przyszłości aplikacyjne wartości jest końcowy fragment badań przeprowadzony na estrgenozależnych komórkach nowotworu piersi opornych na 4-hydroksytamoksyfen, oraz na komórkach o fenotypie potrójnie negatywnym linii MDA-MB-231, co potwierdziło słuszność hipotezy o przeciwnowotworowym współdziałaniu kombinacji badanych związków.

Pani mgr Anna Pawlik wykazała się umiejętnością stosowania nowoczesnych technik badawczych, analizowania uzyskanych wyników oraz głęboką wiedzą z zakresu współzależności ścieżek sygnalizacyjnych w komórce nowotworowej co pozwoliło na rzetelną dyskusję uzyskanych wyników.

Pragnę podkreślić, że część wyników zamieszczonych w recenzowanej rozprawie doktorskiej została już raz poddana wnikliwej ocenie merytorycznej i w 2015 roku opublikowana w artykule naukowym zamieszczonym w *European Journal of Nutrition* (2015,55 1165-1180) Pani mgr Anna Pawlik jest pierwszym autorem tej publikacji.

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani mgr Anny Pawlik „Wpływ łącznego działania 4-hydroksytamoksyfenu i izotiocyjanianów na estrogenozależne komórki nowotworu piersi,” wykonaną pod kierunkiem naukowym prof.UG, dr hab. Anny Harman-Antosiewicz w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego uznaję za istotną i znaczącą w poszukiwaniu dróg efektywnego, z jak najmniejszymi efektami ubocznymi dla pacjenta, hamowania rozwoju nowotworu czego można oczekiwać po wynikach badań uzyskanych dla komórek linii nienowotworowej.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.65 poz. 595 z późn. zm.). Wobec powyższego zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Anny Pawlik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. Maria Rybczyńska