

Dr hab. Joanna Jakubowicz-Gil

Lublin, 21.12.2017

Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie  
ul. Akademicka 19  
20-033 Lublin

### **Recenzja**

#### **rozprawy doktorskiej Pani mgr Urszuli Waszut pt.: "Ocena wpływu mitotanu na ekspresję genów zaangażowanych w regulację metabolizmu mitochondrialnego w ludzkich liniach komórkowych raka kory nadnerczy, płuc, piersi i jelita grubego".**

Pani mgr Urszula Waszut wykonała pracę doktorską w Anglii w Zakładzie Patologii Molekularnej (Department of Molecular Pathology) King's College Hospital, London we współpracy z Zakładem Badań nad Nowotworami (Department of Cancer Research) Kings College London, pod kierunkiem Pani dr hab. n med. Doroty Dworakowskiej. Doświadczenia były finansowane z Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej w ramach projektu POMOST przyznanego dzięki staraniom Pani Promotor.

#### **Ocena merytoryczna pracy**

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska obejmuje dobrze zaplanowane i wykonane badania laboratoryjne, w których Autorka analizowała zmiany ekspresji genów związanych z mitochondrialnym metabolizmem energetycznym, zachodzące pod wpływem mitotanu, związku stosowanego w leczeniu raka kory nadnerczy. Mitotan należy do insektycydów. Do terapii raka nadnerczy został wprowadzony po raz pierwszy w 1960 roku i jak do tej pory nie doczekał się godnego następcy. Skuteczność leczenia mitotatem wciąż nie jest jednoznacznie potwierdzona i wiele sprzecznych informacji, dotyczących skuteczności terapii, pojawia się w literaturze naukowej. Temat jest tym bardziej istotny, iż związek wykorzystywany jest w leczeniu rzadkiego, lecz bardzo złośliwego nowotworu. Rak kory nadnerczy rośnie bowiem w sposób inwazyjny, nacieka na okoliczne tkanki i daje przerzuty go innych narządów (wątroba, płuca).

Dlatego też podjęcie badań, mających na celu dokładniejsze poznanie mechanizmów działania tego związku, uważam za celowe i bardzo uzasadnione.

Jednym z mechanizmów eliminowania komórek pod wpływem mitotanu jest indukcja zaprogramowanej śmierci, apoptozy. Proces ten jest ściśle związany i kontrolowany przez mitochondria, kluczowe organella energetyczne komórki. Dlatego też analiza ekspresji genów, kodujących białka wchodzące w skład łańcucha oddechowego, po zastosowaniu mitotanu może mieć ogromne znaczenie w poznaniu molekularnego mechanizmu działania leku oraz przyczynić się do poprawy skuteczności eliminowania komórek nowotworowych na drodze zaprogramowanej śmierci.

Kolejnym mocnym atutem pracy jest cykl badań, dotyczących możliwości wykorzystania do badań genetycznych tkanki raka kory nadnerczy, uzyskanej po resekcji guza i zatopionej w bloczki parafinowe. Doświadczenia prowadzone na ustalonych liniach komórkowych nie oddają w pełni tego, co dzieje się w żywym organizmie. Umożliwiają jedynie wstępną ocenę oddziaływania związku na komórki. Wykorzystanie do badań materiału pochodzącego od pacjentów pozwala na rzeczywistą ocenę poziomu ekspresji genów z uwzględnieniem wpływu mikrośrodowiska guza na zachowanie komórek nowotworowych. Wyniki uzyskane w tej części pracy poszerzają metodyczny wachlarz badań i dostarczają wielu nowych danych, dotyczących biologii raka kory nadnerczy. Należy mieć nadzieję, że w przyszłości Doktorantka podejmie próbę przeanalizowania ekspresji genów związanych z regulacją metabolizmu energetycznego mitochondriów, jako kontynuacja badań przeprowadzonych na liniach komórkowych.

### **Ocena struktury pracy**

Rozprawa doktorska mgr Urszuli Waszut liczy 162 strony maszynopisu napisanego w języku angielskim. Uzupełnienie stanowi Streszczenie, Podziękowania i informacja o finansowaniu pracy przygotowane dodatkowo w języku polskim. Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich.

Pracę rozpoczyna czytelny Spis treści, Wykaz użytych skrótów oraz Streszczenie.

We Wstępie, liczącym 24 strony, Doktorantka scharakteryzowała model badawczy oraz podsumowała dotychczasową wiedzę, dotyczącą działania mitotanu, zarówno na poziomie

klinicznym, jak i molekularnym. W przystępny sposób przedstawiła sposoby eliminowania komórek nowotworowych na drodze zaprogramowanej śmierci, co zilustrowała przejrzystymi i klarownymi rycinami. Przedstawione po Wstępie cele zostały jasno sformułowane.

Materiały i Metody, w których Doktorantka opisuje wykorzystane do badań techniki, zostały przygotowane bardzo szczegółowo i klarownie, co pozawala na odtworzenie doświadczeń z dużą dokładnością i powtarzalnością. Wyraźnie widać, że Autorka zapoznała się z licznymi nowoczesnymi metodami molekularnymi i dobrze opanowała warsztat badawczy. Warto podkreślić, że metodyka została trafnie dobrana do postawionych celów.

Wyniki zostały opracowane bardzo starannie i dokładnie. Liczne ryciny ułatwiają ich zrozumienie i przeanalizowanie. W obszernej dyskusji Doktorantka konfrontuje uzyskane wyniki z danymi literaturowymi, zachowując odpowiednią dozę krytycyzmu. Co więcej, nie skupia się tylko na obecnie dostępnych danych, lecz przedstawia perspektywy przyszłościowego prowadzenia badań.

Wnioski, podsumowujące uzyskane dane, zostały jasno sformułowane i odpowiadają wyznaczonym celom. Zaletą jest określenie wniosków ogólnych, które w sposób prosty przedstawiają główne osiągnięcia pracy jak i wniosków cząstkowych, wynikających z konkretnych wyników i naznaczonych celów. Pracę kończą złączniki, spis figur (47) i tabeli (18) oraz bogate piśmiennictwo, aktualne i prawidłowo dobrane.

W trakcie analizy rozprawy zauważyłam, że pewne jej fragmenty wymagają korekty i wyjaśnienia.

1. W postawionych celach, Doktorantka wspomina o indukcji apoptozy pod wpływem mitotanu, analizując w tym aspekcie jedynie poziom ekspresji genów związanych z procesem zaprogramowanej śmierci. Dodatkowe zbadanie tego procesu na poziomie białkowym (aktywność specyficznych markerów) lub komórkowym (analiza morfologiczna komórek) jednoznacznie potwierdziłoby stopień wrażliwości badanych komórek na indukcję apoptozy pod wpływem mitotanu.

2. W rozdziale Materiały i Metody pojawiła się informacja, iż komórki H259R były inkubowane z mitotanem przez 24 godziny, podczas gdy pozostałe linie przez 48 godzin. W rozdziale Wyniki

analizowane są komórki traktowane badanym związkiem przez 72 godziny. Proszę o wyjaśnienie tej rozbieżności. Gęstość komórek powinna być zapisana, jako  $790 \times 10^3$  a nie  $790 \times 103$ , jak to ma miejsce w tekście.

3. W pierwszym wniosku, odpowiadającym celowi nr 1, pojawia się informacja o optymalizacji badań w stosunku do mTOR, podczas gdy białko było wykorzystywane w badaniach nad izolacją materiału genetycznego ze skrawków parafinowych (cel nr 4)

W pracy pojawiło się wiele usterek językowych i edytorskich takich jak:

- zbyt ogólne rozwinięcie skrótu TRK opisane jako „tyrosine kinase” podczas gdy powinno być „tyrosine receptor kinase” lub „tropomyosine receptor kinase”
- brak pisowni „*in vivo*” i „*in vitro*” kursywą
- sposób cytowania literatury w tekście pracy, pisownia linii komórkowej HKe-3 (lub synonimu Hke-3) oraz pisownia jednostek miar po wartościach liczbowych nie jest ujednoczona
- używanie sformułowania „bloki parafinowe” zamiast „bloczki parafinowe”
- tłumaczenie słowa „Department”, jako Departament w odniesieniu do słowa Zakład
- niefortunne sformułowanie „izolacja mRNA z guzów parafinowych” w odniesieniu do izolacji mRNA z guzów pochodzących bloczków parafinowych
- używanie zbyt potocznego sformułowania „nadekspresja VEGFów” na określenie poziomu ekspresji VEGF
- powtórzenie fragmentu rozdziału 3.1 Materiały i Metody w rozdziale 3.1.1

Zauważyłam ponadto bardzo dużo błędów literowych, szczególnie w polskiej wersji Podziękowań i Streszczeniu. Co więcej, polskie tłumaczenie tych rozdziałów nie pokrywa się z wersją anglojęzyczną.

Powyższe uwagi krytyczne nie umniejszają wartości merytorycznej pracy. Autorka wykazała umiejętność samodzielnego rozwiązywania postawionych zadań naukowych, dobre opanowanie metod badawczych oraz znajomość literatury. Uzyskane przez doktorantkę wyniki stanowią Jej oryginalne osiągnięcie i poszerzają wiedzę o molekularnym mechanizmie działania mitotanu i możliwości skuteczniejszego wykorzystania związku w terapii.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona do zaopiniowania praca doktorska Pani Urszuli Waszut zatytułowana „**Ocena wpływu mitotanu na ekspresję genów zaangażowanych w regulację metabolizmu mitochondrialnego w ludzkich liniach komórkowych raka kory nadnerczy, płuc, piersi i jelita grubego**” spełnia wymogi stawiane rozprawie doktorskiej i wnoszę o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Joanna Jakubowicz-Gil