

Prof. dr hab. med. Grzegorz DWORACKI
Katedra Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

ul. Rokietnicka 5D
60-508 Poznań

tel. +48 61 854 7174
e-mail: gdwreck@ump.edu.pl

Ocena pracy doktorskiej
Mgr Urszuli Aliny WASZUT
pt. "OCENA WPLYWU MITOTANU NA EKSPRESJĘ GENÓW
ZAANGAŻOWANYCH W REGULACJĘ METABOLIZMU
MITOCHONDRIALNEGO W LUDZKICH LINIACH KOMÓRKOWYCH RAKA
KORY NADNERCZA, PŁUC I JELITA GRUBEGO".

Poszukiwanie skutecznych leków w terapii nowotworów, a przy tym mało toksycznych dla prawidłowych komórek i tkanek jest ciągłym wyzwaniem w terapii onkologicznej. Leki te są tym skuteczniejsze im lepiej rozumiemy ich działanie i szlaki metaboliczne, które są zaangażowane i pełną wiodącą rolę w utrzymaniu procesów życiowych w poszczególnych typach nowotworów.

Pani Magister Urszula Alina WASZUT podjęła ważny poznawczy, a równocześnie praktyczny, w ocenie recenzenta temat poszukiwania punktów uchwytu na poziomie molekularnym działania leku mitotanu, stosowanego w terapii raka kory nadnerczy (adrenocortical carcinoma).

Rak kory nadnerczy jest rzadkim i agresywnym nowotworem o złym rokowaniu. W jego terapii najskuteczniejszym lekiem jest mitotan. Związek ten pomimo że jest znany od dawna, bo od lat czterdziestych ubiegłego wieku, kiedy używany był pierwotnie jako insekcyd (znamiennik popularnego DDT) nie posiada w pełni określonego mechanizmu działania. Znajomość działania mitotanu ograniczała do opisu zmian toksycznych jakie wywołuje w mitochondriach i wpływu na indukcję programowanej śmierci komórek. Nie jest do tej pory dokładnie wyjaśniony biochemiczny i molekularny punkt uchwytu działania tego związku. Wiadomo jest, że lek ten działa cytotoksycznie na korę nadnerczy modyfikując obwodowy metabolizm steroidów, wyraźnie zwiększa przy tym syntezę 6-beta-hydroksycholesterolu. Działanie toksyczne jest wyraźnie selektywne, dotyczy wyłącznie warstwy siatkowatej i pasmowatej kory nadnerczy, które odpowiadają za produkcję glikokortykosteroidów. Mitotan nie wpływa na warstwę kłębkową, produkującą aldosteron.



Biorąc pod uwagę dostępne dane, z których jasno wynika, że mitotan doprowadza do zmian ultrastrukturalnych w mitochondriach, prowadzi do apoptozy komórek, a co z tego wynika może mieć wpływ na mitochondrialny metabolizm energetyczny, logicznym wnioskiem jest poszukiwanie miejsc działania mitotanu wśród genów związanych z aktywnością energetyczną mitochondrium, głównie tych genów które są zaangażowane w metabolizm tlenowy i procesy programowanej śmierci związanych ze szlakami metabolicznymi realizowanymi w mitochondriach.

Kandydatka postawiła sobie za cel ocenę poziomu ekspresji 84 genów uczestniczących w mitochondrialnym metabolizmie energetycznym pomiędzy liniami raka kory nadnercza (H295R), gruczołu sutkowego (MCF-7), jelita grubego (HKe-3) i raka płuca (H195R) w warunkach hodowli bez i po podaniu mitotanu.

W pracy podjęto także próbę ustalenie procedury, która pozwoliłaby na ekstrakcję mRNA do oceny ekspresji genów z materiału tkankowego izolowanego z kostek parafinowych. Przełamanie technologicznej bariery oceny ekspresji genów na takim materiale otwiera dostęp do materiału biologicznego zgromadzonego w archiwach histologicznych, co docelowo może mieć istotne znaczenie w ocenie mikrośrodowiska tkankowego nowotworów oraz potencjalnie wartość diagnostyczną.

Wybór ekspresji genów metabolizmu tlenowego w opinii recenzenta jest zasadny i potwierdza celowość podjęcia trudu wykonania żmudnych badań. Dowodzi także dużej wiedzy i krytycznego przemyślenia podstaw podjętego tematu pracy przez doktorantkę.

Układ pracy jest typowy dla tego typu opracowań i obejmuje wszystkie wymagane części.

We wstępie, liczącym 23 strony, autorka bardzo szczegółowo przedstawia samo tło historyczne użycia mitotanu, efekty działania na tkanki nadnercza, mechanizmy śmierci komórek kory nadnercza w porównaniu z innymi liniami komórkowymi. Kandydatka szczegółowo przytacza znane fakty dotyczące wpływu mitotanu na szlaki metaboliczne dotyczące metabolizmu tlenowego i steroidogenezy uwzględniając autonomiczne znaczenie mitochondriów; opisuje szczegółowo wpływ na mitochondria, pojawiające się zmiany ultrastrukturalne i szlaki indukcji apoptozy w tym związane z udziałem mitochondriów. Osobno opisuje wykorzystane linie komórkowe oraz przytacza fakty piśmiennicze z podejmowanych prób z oceną ekspresji genów na poziomie mRNA z materiału kostek parafinowych. Ponadto we wstępie szczegółowo opisuje kliniczne możliwości i efekty użycia mitotanu.



Wstęp pracy w opinii recenzenta we właściwych proporcjach podejmuje istotne do podjętego tematu pracy zagadnienia i w wyczerpujący sposób, ale nie nadmierny, wyjaśnia to co dla podjętego tematu jest ważne. Ponadto opis opatrzone jest czytelnymi rycinami, z których większość stanowi modyfikacje schematów dostępnych w piśmiennictwie naukowym, co jest odpowiednio zaznaczone. Tam gdzie autorka uznała to za konieczne przedstawia własne ryciny (np. rycina 4) co jest cenne jako własna czytelna ilustracja opisywanych procesów biologicznych. Zakres i wnikliwość, co do szczegółów przedstawianych zagadnień dowodzi bardzo dobrego teoretycznego przygotowania doktorantki do podjętego tematu.

Cel pracy sformułowany jest jasno i zawiera się w czterech punktach. Trzy pierwsze dotyczą bezpośrednio mitotanu. Ostatni jest celem metodycznym dotyczącym próby rozwinięcia skutecznej metody izolacji mRNA dla potrzeb oceny ekspresji genów z materiału kostek parafinowych. W opinii recenzenta najciekawszy, choć może najtrudniejszy do osiągnięcia jest cel trzeci, bo dotyczy próby wyjaśnienia wybiórczości mechanizmu działania mitotanu na komórki kory nadnerczy. Dwa pierwsze w opinii recenzenta są bardziej cząstkowymi celami do realizacji celu trzeciego.

W rozdziale materiały i metody kandydatka bardzo szczegółowo przedstawiła wszystkie etapy realizacji pracy, opisując poszczególne elementy w czytelnych tabelach i często kolorowych rycinach. Opisuje przy tym w najdrobniejszych detalach wszystkie wykorzystywane odczynniki, etapy procedur laboratoryjnych oraz sposób formułowania wyników. Opisuje przy tym wystarczająco dokładnie i przejrzysto pięć komponentów i tworzących je genów związanych z transportem elektronów łańcucha oddechowego mitochondriów, których ekspresja była oceniana w pracy. Duża liczba przytaczanych szczegółów metodycznych jednak nie przytłacza, bo jest logicznie i przejrzysto zorganizowana oraz opatrzone czytelnymi podsumowującymi schematami i ilustracjami. Wysoka jakość opisu metodycznego stosowanych procedur badawczych, stosowanych metod molekularnych i biochemicznych, wielokrotnie opatrzone istotnymi i metodycznie pomocnymi pozycjami piśmiennictwa, dowodzi pośrednio biegłości technicznej w ich stosowaniu przez Kandydatkę. Recenzent nie ma zasadniczo uwag do części metodycznej poza jedną drobną. Autorka opisuje że materiał kostek parafinowych został skrojony na grubość 0,7 (mm) milimetra, a uprzednio skrawki tkankowe były zabarwiane do wyznaczenia obszaru w preparacie który dotyczył nowotworu. Z pewnością grubość zabarwianych skrawków parafinowych była znacznie mniejsza, bo inaczej nie dałoby się ocenić ich struktury w badaniu histologicznym.



Analiza molekularna, stanowiąca ważną i istotną część pracy badawczej, obejmowała szeroki zakres metod molekularnych opartych głównie na technikach hodowli komórkowych, izolacji mRNA i Real-Time PCR oraz ich modyfikacjach. W opinii recenzenta techniki badawcze zostały właściwie dobrane w zestawieniu z postawionymi celami pracy, dowodzą dużej biegłości warsztatowej kandydatki i co nie ulega wątpliwości obecności na każdym etapie pracy promotora rozprawy.

Badania w opinii recenzenta zostały prawidłowo zaplanowane i przeprowadzone, zastosowano właściwą metodykę dla realizacji założonych celów badań. Zwraca uwagę fakt, że kandydatka samodzielnie, wszędzie, gdzie tylko było to możliwe wykonywała większość doświadczalnych elementów pracy, a także opisu i analizy wyników, równocześnie współpracując efektywnie tam, gdzie było to konieczne. Nie bez znaczenia pozostaje fakt, że prace zostały w dużej mierze wykonane w ramach grantu POMOST /2012-5/3 przyznanego promotorowi dr hab. Dorocie Dworakowskiej i współfinansowanego przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej i Unię Europejską, a w dużej mierze realizowanego w Department of Cancer Research w King's College w Londynie. Praca w laboratorium w uznanym ośrodku zagranicznym dając często duże możliwości jest także zazwyczaj ogromnym wyzwaniem, któremu nie każdy, czego nigdy nie widać potrafi sprostać. Patrząc na zakres i efekty wykonanej pracy Kandydatka tym wyzwaniom wydaje się że, sprostała bardzo dobrze.

Rozdział „Wyniki” stanowią znaczną część pracy. Uzyskane dane przedstawiono w przejrzystej formie, w czytelnych graficznych zestawieniach, dokumentując je dobrze dobranymi i rycinami. Autorka w ocenie recenzenta stosuje właściwy sposób opisu wyników, właściwie dobrała testy statystycznie, wyciągając z uzyskanych wyników poprawne wnioski. Wyniki zostały przedstawione w formie czytelnych i przekonujących wykresów i tabel opatrzonych czytelnie zredagowanymi legendami, z czytelnym wyszczególnieniem istotności statystycznych. Co ważne przy dużej liczbie wyników ich opis nie jest tylko prostym ich przedstawieniem, ale odpowiednio je grupuje, hierarchizuje, wyszczególniając i podejmując dyskusję tam gdzie jest to konieczne z punktu widzenia stawianych w pracy celów.

Dyskusja jest dość obszerna, obejmuje 18 stron. W opinii recenzenta jest jednak dobrym przeglądem piśmiennictwa molekularnych efektów działania mitotanu, jednak w małym stopniu stanowi bezpośrednią dyskusję własnych wyników na tle tego co jest dostępne w piśmiennictwie przedmiotu; sformułowania typu „in this study” pojawiają się jedynie w pojedynczych przypadkach, a przynajmniej giną w tle faktów przytaczanych z piśmiennictwa,



które luźno są związane z wynikami pracy. Należy jednak wspomnieć, że w dyskusji jest cytowanych szereg prac zespołu badawczego Promotora i Doktorantki co stanowi ciąg logiczny pracy i dyskusji i stanowi bardziej dyskusję tematu niż wyników pracy. Trzeba także zauważyć, że podjęty temat pracy w zakresie podejmowanych działań badawczych jest stosunkowo nowy, dlatego też nie jest zbyt wiele punktów odniesienia. Dlatego też szkoda, że w dyskusji nie wyszczególniono zupełnie nowych obserwacji, które zostały w pracy poczynione. Ciekawym fragmentem dyskusji jest część dotycząca możliwości oceny ekspresji genów w materiale mRNA izolowanego z kostek parafinowych. Wyniki wykonanych prac pokazują, że prosta zmiana procedury jak mechaniczne zeszkrobywanie materiału tkankowego bezpośrednio ze szkiełka skalpelem, a nie narzędziem laserowym, które jednak degraduje DNA i może w istotny sposób wpłynąć na stabilność DNA i możliwości skutecznej oceny ekspresji genów. Autora wskazuje, że najbardziej uderzającą różnicą w ocenie ekspresji genów pomiędzy rakiem kory nadnerczy, a prawidłową korą nadnerczy była nadekspresja VEGF w raku nadnercza. Należy docenić krytycyzm Doktorantki która zauważa, że komórki linii w hodowli komórkowej, to nie to samo co nowotwór w swoim tkankowym mikrośrodoisku, które może stanowić znaczną, a czasami zasadniczą część nacieku nowotworowego. Komórki nowotworowe w pierwotnym mikrośrodoisku mogą mieć znacznie różniący się profil molekularny w porównaniu z tym co jest w hodowli komórkowej. Szkoda jednak, że widząc różnice odnośnie produkcji VEGF Autorka wskazuje jedynie na takie elementy mikrośrodoiska nowotworu jak fibroblasty, martwicę, nie wspominając chociażby o komórkach zapalnych, w tym na makrofagi, które prawie zawsze są obecne w mikrośrodoisku nowotworów i są istotnym źródłem produkcji różnych czynników zaangażowanych w promocję i wzrost nowotworów w tym wspomniany VEGF.

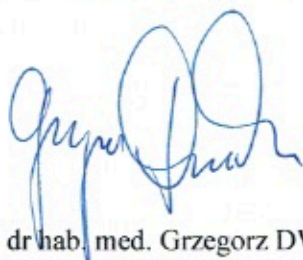
Przedstawione wnioski są szczegółowo i jasno sformułowane, odnoszą się bezpośrednio do celów pracy. Co ważne wnioski są ostrożne, tam gdzie jest to potrzebne i jednoznaczne tam, gdzie uzyskane wyniki na to pozwalają. Świadczy to dojrzałości badawczej autora. Pewien krytycyzm u recenzenta budzi jednak nadmierny opis, a nawet dyskusja, która stanowi część wniosków. Dotyczy to w szczególności wniosku trzeciego i czwartego, które mógłby być bardziej zwięzłe. Autorka zauważa jednak potrzebę bardziej zwięzłego podsumowania, które zostały zawarte na końcu wniosków w ich podsumowaniu; zmieniłbym kolejność.

Praca napisana jest w języku angielskim. Styl i język pracy pomimo, że nie jest to język ojczysty kandydatki jest komunikatywny i jasny, plastycznie i obrazowo przedstawia, trudne i czasami nużące ze swej natury szczegóły, łatwo prowadząc czytelnika przez skomplikowane zagadnienia kliniczne i doświadczalne. Autorka nie uniknęła jednak drobnych potknięć

językowych takich jak na przykład użycie sformułowania w polskich fragmentach pracy zwrotu „w porównaniu do” zamiast „w porównani z”, co jest typowym zapożyczeniem z języka angielskiego. Co ciekawe w wersji angielskiej pracy używa wielokrotnie sformułowania „in comparison with” zamiast co jest właściwsze „in comparison to”; co może jest jednak nie tyle błędem ale jednak dowodem przywiązania do języka polskiego.

W podsumowaniu chciałbym podkreślić, że bardzo drobne uwagi recenzenta w żaden sposób nie wpływają na wartość merytoryczną pracy. Z pełnym przekonaniem chciałbym stwierdzić, że Pani magister Urszuli Aliny WASZUT przedstawiła rozprawę doktorską na bardzo wysokim poziomie merytorycznym, zawierającą cenne wyniki, poszerzające i wzbogacające zakres wiedzy o nowe nie znane dotąd fakty i praktyczne wnioski, które z pewnością będą opublikowane w specjalistycznym piśmiennictwie o szerokim zasięgu. Warte podkreślenia jest także, że wyniki pracy zostały w części już opublikowane w czasopiśmie o szerokim zasięgu i na międzynarodowych zjazdach.

Na podstawie dokonanej oceny stwierdzam, iż rozprawa doktorska zatytułowana „OCENA WPŁYWU MITOTANU NA EKSPRESJĘ GENÓW ZAANGAŻOWANYCH W REGULACJĘ METABOLIZMU MITOCHONDRIALNEGO W LUDZKICH LINIACH KOMÓRKOWYCH RAKA KORY NADNERCZA, PŁUC I JELITA GRUBEGO” w pełni odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie medycyna i w związku z tym mam zaszczyt przedstawić Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku wniosek o dopuszczenie Pani magister Urszuli Aliny WASZUT do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. med. Grzegorz DWORACKI

Poznań dnia 31 marca 2018