

Prof. dr hab. Piotr Skowron
Kierownik
Katedra Biotechnologii Molekularnej
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 16.11.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Claudii Musiał pod tytułem:

„Biologiczne implikacje wybranych metabolitów 17 β -estradiolu w regulacji mechanizmów śmierci i przeżywalności komórek ludzkiego gruczolaka płuca, określone na podstawie dwuwymiarowych i trójwymiarowych modeli komórkowych”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Claudii Musiał pod tytułem „Biologiczne implikacje wybranych metabolitów 17 β -estradiolu w regulacji mechanizmów śmierci i przeżywalności komórek ludzkiego gruczolaka płuca, określone na podstawie dwuwymiarowych i trójwymiarowych modeli komórkowych” została wykonana pod promotorstwem dr hab. Magdaleny Górskiej-Ponikowskiej, prof. Uczelni, Kierownik Katedry i Zakładu Chemii Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Rozprawa doktorska Pani mgr Claudii Musiał ma charakter hybrydowy. Złożona jest z 2 części: 1. Prac opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, o wysokim ang. Impact Factor oraz 2. Dodatkowych, jeszcze nieopublikowanych wyników uzupełniających. Jedną z przedstawionych do recenzji prac zawierającą część wyników Doktorantki to praca oryginalna opublikowana w Redox Biology pod tytułem „Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer. (2022). Kolejną pracą to artykuł przeglądowy „Plausible Role of Estrogens in Pathogenesis, Progression and Therapy of Lung Cancer” opublikowany w Int. J. Environ. Res. Public Health (2021). Rozprawa doktorska liczy 97 stron, 65 pozycji literaturowych i załączniki w postaci wspomnianych artykułów. Z uwagi na charakter hybrydowy rozprawy doktorskiej nie ma ona tradycyjnego rozkładu, Doktorantka wprowadza w tematykę badawczą streszczeniami w językach polskim i angielskim oraz wprowadzeniem. Kolejno, opisuje cel pracy, publikacje wchodzące w skład rozprawy, metodykę, nieopublikowane wyniki, dyskusję, wnioski, literaturę oraz spis tabel i rycin. Załącza również dodatkowe informacje takie jak dane bibliometryczne oraz udział w projektach badawczych.

W sekcji Wprowadzenie znajduje się szczegółowy opis czynników biochemicznych wywołujących lub związanych z rakiem płuca. Jest to zrozumiałe, gdyż praca ma charakter biochemiczny. Niemniej, brakuje mi w tej części akapitu opisującego czynniki genetyczne. Tutaj zaliczyć można: 1. Mutacje genów supresorowych nowotworów, np. p53 i RB1, które odgrywają kluczową rolę w regulacji wzrostu komórek i naprawie DNA. Mutacje w tych genach mogą prowadzić do niekontrolowanego wzrostu komórek, 2. Mutacje genów onkogennych, np. EGFR, ALK, ROS1 i BRAF, mogące ulegać mutacjom, które nadają komórkom zdolność do niekontrolowanego wzrostu i podziału. Pacjenci z takimi mutacjami często reagują na leki celowane. 3.

Rearanżacje i fuzje genów, takie jak EML4-ALK, ROS1 i RET. Te zmiany molekularne mogą prowadzić do aktywacji szlaków sygnalizacyjnych, które sprzyjają wzrostowi nowotworu, 4. Mutacje w genach kontrolujących cykl komórkowy, takie jak p16 i CDK4, mogą wpłynąć na regulację podziału komórek i przyczynić się do rozwoju raka płuc, 5. Zmiany epigenetyczne w metylacji DNA i modyfikacjach histonów mogą wpływać na ekspresję genów związanych z rakiem płuc, regulując ich aktywność.

Jedną z moich uwag dotyczy braku danych bibliometrycznych publikacji wchodzących w skład dzieła przedstawianych na stronach 22-24 tejże rozprawy. Bardziej spójne, w szczególności biorąc pod uwagę nietypową formę rozprawy doktorskiej, byłoby również przedstawienie ponumerowanych danych bibliometrycznych Doktorantki na końcu pracy, po literaturze i spisie rycin. Jednak mimo powyższych uwag, uważam, że ten nietypowy układ jest bardzo ciekawy i wart rozpowszechnienia, co najmniej z 3 powodów: 1. Dołączenie najnowszych wyników do prac już opublikowanych i zrecenzowanych stanowi najbardziej aktualne kompendium rozwiązania problemu badawczego, wskazanego w pracy, 2. Przyspiesza proces uzyskania doktoratu co jest istotne dla dalszej kariery zawodowej kandydata oraz 3. Zauważalnym trendem w wymaganiach czasopism naukowych jest ograniczanie objętości publikowanych prac. Podobnie, zastosowane podejście hybrydowe oszczędza objętość pracy doktorskiej i chroni przed częstą manierą prezentowania prac doktorskich o nadmiernej objętości, gdzie rozwlekłe opisy metod, wyników są niepotrzebnym duplikowaniem publikacji doktoranta.

Doktorantka podjęła ambitny temat badawczy jakim jest rak płuca czyli jedno z największych wyzwań w leczeniu onkologicznym. Jak wskazuje we wstępie w ciągu ostatniej dekady coraz częściej wykazano znaczące różnice w częstości występowania raka płuca między kobietami i mężczyznami. Przyjmuje się, że obok czynników ekspozycyjnych, genetycznych i epigenetycznych niezwykle istotne wydają się czynniki związane z hormonami płciowymi. Gruczolakorak płuca wybrany przez Doktorantkę jako model badawczy jest jednym z głównych nowotworów niedrobnokomórkowych. Co ciekawe, jest to najczęściej występujący podtyp nie drobnokomórkowego raka płuca u pacjentów nigdy nie palących tytoniu. Częstość występowania wskazanego nowotworu u kobiet jest trzykrotnie wyższa, aniżeli u mężczyzn. Stąd, też wybór tematu badawczego uważam za naukowo i klinicznie istotny.

Kluczowym celem pracy, który obrała sobie Doktorantka było określenie roli wybranych metabolitów 17β -estradiolu w regulacji mechanizmów śmierci i przeżywalności komórek nowotworu płuca z wykorzystaniem dwuwymiarowych i trójwymiarowych komórkowych modeli gruczolakoraka płuca.

Natomiast, szczegółowymi celami rozprawy doktorskiej było:

1) ustalenie biologicznych implikacji wybranych metabolitów 17β -estradiolu w regulacji mechanizmów śmierci i przeżywalności komórek ludzkiego gruczolakoraka płuca, określone na podstawie dwuwymiarowych i trójwymiarowych modeli komórkowych.

2) ocena właściwości cytotoksycznych i cytostatycznych analizowanych związków, jak również ustalenie rodzaju i mechanizmów śmierci komórkowej w postaci wybranych metabolitów 17β -estradiolu wobec linii ludzkich komórek nowotworowych gruczolaka płuca A549 2D oraz 3D sferoidalnej w warunkach hodowli laboratoryjnej in vitro;

3) ustalenie zależności w zakresie wybranych metabolitów 17β -estradiolu w warunkach in vivo, u pacjentów z gruczolakorakiem płuca, na podstawie analizy surowicy krwi.

W tej części rozprawy brakuje precyzyjnego określenia hipotezy badawczej. Jednakże cele pracy zostały sformułowane jednoznacznie i odzwierciedlają postawione przez Doktorantkę zadania do wykonania w ramach zaplanowanych badań, spełniając funkcję hipotezy badawczej.

Następnie Doktorantka opisuje założenia publikacji „Plausible Role of Estrogens in Pathogenesis, Progression and Therapy of Lung Cancer” opublikowanej w International Journal of Environmental Research and Public Health. Praca jest wieloautorska i powstała we współpracy zagranicznej. Doktorantka jest pierwszym autorem tej pracy. Ostatnim i korespondującym autorem jest Promotor rozprawy dr hab.n.med. Magdalena Górską-Ponikowska, prof. uczelni. W tej przeglądowej publikacji Doktorantka przedstawia podsumowanie aktualnej wiedzy na roli estrogenów w etiopatogenezie raka płuca, a także biologicznych implikacji gruczolaka płuca, w szczególności u kobiet.

Następnie doktorantka pokrótce omawia kolejną publikację pod tytułem „Induction of 2-hydroxycatecholestrogens O-methylation: A missing puzzle piece in diagnostics and treatment of lung cancer” opublikowaną w czasopiśmie Redox Biology. Jest to bardzo prestiżowe czasopismo, a cytowana publikacja jest pierwszą pracą dotyczącą w szczególności roli palmitoilacji w mechanizmie działania 2-metoksyestradiolu. Jest to niezwykle ciekawe odkrycie na skalę światową. Praca jest artykułem oryginalnym, jak poprzednia pracą wieloautorską i powstała we współpracy zagranicznej. Doktorantka jest pierwszym autorem tej pracy. Ostatnim i korespondującym autorem jest Promotor rozprawy dr hab.n.med. Magdalena Górską-Ponikowska, prof. uczelni.

Celem tej pracy było przedstawienie wpływu wybranego endogenego metabolitu 17β -estradiolu, w postaci 2-metoksyestradiolu na komórki niedrobnokomórkowego raka płuca w hodowli komórkowej in vitro. Wyniki przede wszystkim przedstawiają, że 2-ME zmniejsza żywotność gruczolaka płuca w dwuwymiarowych i trójwymiarowych sferoidalnych modelach hodowli komórkowej nowotworu płuca A549. Jak wskazuje Doktorantka „potwierdzono także śmierć komórkową indukowaną 2-ME (w postaci martwicy oraz późnej apoptozy) w modelu komórkowym raka płuca”. Określenie martwicy uważam za nieco niefortunne określenie, zapewne Doktorantce chodziło o typ śmierci komórki – nekrozę.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazała rolę pochodnych estradiolu, w szczególności 2-metoksyestradiolu w regulacji śmierci komórek zastosowanego modelu nowotworu płuca. Jak podkreśla

Doktorantka wyniki niniejszego badania wskazują na możliwe zastosowanie estrogenów zarówno hydroksylowanych, jak i metylowanych w pozycji 2, jako potencjalnych biomarkerów nowotworów płuca.

Niestety, w tym miejscu Recenzent musi podkreślić niedopracowanie tej sekcji rozprawy. Doktorantka nie wskazuje autorów pracy, nie podaje danych bibliometrycznych publikacji, które są umieszczone w innej części rozprawy doktorskiej. Ponadto, Doktorantka nie stosuje się do konsekwencji skrótów, które wymienia kolejny raz dla 2-metoksyestradiolu, hodowli 2D, 3D, a innych związków nie cytując „Na podstawie uzyskanych wyników ustalono, że estrogeny, a konkretnie E1, E2, E3 oraz ich metabolity: 2-OHE1, 2-OHE2, 4-OHE1, 4-OHE2, 2-OME1 i 2-OME2 znajdują się na znacznie wyższych poziomach w tkance nowotworowej płuca niż w tkance płucnej zdrowej kobiety w grupie kontrolnej”. To utrudnia czytanie tej części rozprawy doktorskiej. Należy jednak podkreślić innowacyjność, aspekt poznawczy i kliniczny rozprawy doktorskiej i tej części badań.

W tym miejscu podnieść należy imponujący na tym etapie rozwoju kariery naukowej całkowity dorobek naukowy doktorantki: poza 2-ma publikacjami, stanowiącymi część pracy doktorskiej, doktorantka jest współautorką 4-rech publikacji o zasięgu międzynarodowym o sumarycznym Impact Factor 23,15, a wraz z publikacjami stanowiącymi część pracy doktorskiej aż 38,5. Ponadto, w dorobku doktorantki znajdują się 2 książki autorskie w języku polskim, 7 branżowych publikacji w języku polskim i angielskim oraz 16 wystąpień konferencyjnych. Dowodzi to bardzo wysokiej aktywności naukowej doktorantki.

W kolejnej części pracy, Doktorantka omawia materiały i metody, w tym metodykę hodowli komórkowej i jej optymalizację w modelu trójwymiarowym, jak również wykonanie badań z udziałem pacjentów.

W pierwszej części wyników Doktorantka omawia Wpływ wybranych metabolitów 17β -estradiolu - 2-metoksyestradiolu, 2-hydroksyestradiolu, estradiolu oraz estriolu na żywotność komórek A549 niedrobnokomórkowego raka płuca w modelu dwuwymiarowym i trójwymiarowym sferoidalnym.

Moje pytanie do tej części dotyczy wytłumaczenia wyboru akurat tych metabolitów estradiolu. Jaki inny test do badania cytotoksyczności mógłby zostać użyty przy tej części badań?

W tej części również nie jest stosowana konsekwencja skrótów. Doktorantka naprzemiennie pisze skrótami i całymi nazwami.

W kolejnej części rozprawy doktorskiej Doktorantka analizuje udział reaktywnych form tlenu w mechanizmie działania metabolitów estradiolu.

Doktorantka używa ponownie niefortunnych sformułowań, wynikających prawdopodobnie z bezpośredniego tłumaczenia z języka angielskiego t.j. „Indukcja sygnału reaktywnych form tlenu w hodowli komórkowej A549 traktowanej 2-metoksyestradiolem”.

W tej części pracy Doktorantka wykazała, iż poziom stresu oksydacyjnego mierzony stężeniem nadtlenu wodoru okazał się znacznie wyższy niż w modelach kontrolnych.

Przy tej części pracy doktorskiej proszę Doktorantkę o doprecyzowanie i wyjaśnienie kilku kwestii:

- Proponowany mechanizm zwiększania poziomu nadtlenu wodoru przez 2-metoksyestradiol
- Dlaczego tylko ten metabolit został użyty do opisywanych badań?
- Rycina 6 – Podpisy pod osią są niejasne. Doktorantka wskazuje kontrole, oraz komórki traktowane DCF i 2-metoksyestradiolem, a kolejno dodatkowo jodkiem propidyny. Zarówno DCF jak i jodek propidyny są to wskaźniki. Wynik powinien zostać określony jako 2-ME.
- Dlaczego Doktorantka użyła przy tym eksperymencie dodatkowo próbę z jodkiem propidyny?

Kolejno, Doktorantka przechodzi do analizy śmierci komórkowa indukowanej 2-metoksyestradiolem, czyli nekrozy i późnej apoptozy w modelu komórkowym raka płuca.

Tutaj pojawia się również pytanie Recenzenta dlaczego Doktorantka nie analizowała komórek we wczesnej fazie apoptozy?

Kolejno Doktorantka opisuje bardzo ciekawe wyniki dotyczące efektu działania 2-metoksyestradiolu i 3-Bromopirogronianu wobec zastosowanego dwuwymiarowego modelu badawczego komórek raka płuca.

- Doktorantka, niestety nie wyjaśniła, czy obserwowany jest efekty synergistyczny czy addytywny. Poproszę w tym miejscu Doktorantkę o wskazanie metodyki, aby taką interakcję wykazać.
- Jaki mechanizm działania jest według Doktorantki odpowiedzialny za ten efekt. Warto byłoby takie badania wykonać, aby dopełnić otrzymany wynik.

Kolejno, Doktorantka przechodzi do analizy nowej śmierci komórki – Nekroptozy i ferroptozy indukowanej przez 2-metoksyestradiol w hodowli sferoidalnym modelu komórek raka płuca. Podjęcie tego tematu jest szczególnie warte podkreślenia bo są to pierwsze dane na temat tych typów śmierci komórki indukowanych przez 2-metoksyestradiol. Wyniki te przy wykonaniu dodatkowych badań są niewątpliwie warte publikacji.

Następnie, Doktorantka przechodzi do analizy surowicy krwi pacjentów onkologicznych z niedrobnokomórkowym rakiem płuca, co jest bardzo ważnym klinicznym aspektem rozprawy doktorskiej. Stwierdziła zależność odnośnie stężeń poszczególnych form metylowych i katecholowych u pacjentów chorych na raka płuca w porównaniu z grupą kontrolną. Wynik ten ma ogromną wartość diagnostyczną i jest świetnym przełożeniem translacyjnego aspektu rozprawy doktorskiej. Ta część badan jest napisana starannie i przejrzysto, a wyniki przedstawione są w formie jasnej tabeli.

W kolejnym rozdziale Doktorantka dyskutuje z uzyskanymi wynikami, podsumowuje uzyskane wyniki badań wskazując ich innowacyjność, a następnie podsumowuje schematem.

Zaprezentowana przez Doktorantkę rozprawa doktorska w sposób logiczny i konsekwentny odzwierciedla kontekst badań i potwierdza znajomość problematyki implikacji wybranych metabolitów 17 β -estradiolu, skupiając się na 2-metoksyestradiolu, w regulacji mechanizmów śmierci i przeżywalności komórek ludzkiego gruczolaka płuca. Należy zwrócić uwagę, że Doktorantka zaznacza w odpowiednich miejscach nowatorskie aspekty swoich badań oraz ich potencjalne wykorzystanie w dziedzinie onkologii. Co warto podkreślić, Doktorantka podchodzi krytycznie do otrzymanych wyników badań, optymalizując warunki eksperymentów t.j. w przypadku hodowli trójwymiarowej.

W swojej pracy doktorskiej Doktorantka nie ustrzegła się jednak błędów edytorskich, jednak w opinii recenzenta, wskazane kwestie edytorskie mają podrzędne znaczenie i nie umniejszają bardzo wysokiej wartości naukowej rozprawy doktorskiej.

Wniosek końcowy

Podsumowując, zarówno merytoryczna jak i metodyczna strona rozprawy doktorskiej zasługuje na uznanie. Sugestie recenzenta wskazane w poszczególnych częściach recenzji, pozostawiam Doktorantce do rozważenia przy ewentualnej publikacji wyników badań. Jednocześnie zaznaczam, iż moje uwagi nie umniejszają wartości poznawczej oraz klinicznej niniejszej rozprawy doktorskiej. Uważam, że gdyby wszystkie zaprezentowane w przedstawionej pracy wyniki zostały opublikowane, praca kwalifikowałaby się do stosownego wyróżnienia.

Rozprawa doktorska Pana mgr Claudii Musiał pod tytułem „Biologiczne implikacje wybranych metabolitów 17 β -estradiolu w regulacji mechanizmów śmierci i przeżywalności komórek ludzkiego gruczolaka płuc, określone na podstawie dwuwymiarowych i trójwymiarowych modeli komórkowych spełnia w pełni wymogi ustawowe stawiane pracom doktorskim, zgodnie z art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2021 r. poz. 478 ze zm.).

Zwracam się zatem do Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana mgr Claudii Musiał do dalszych etapów przewodu doktorskiego

KIEROWNIK
Katedry Biotechnologii Molekularnej

Prof. dr hab. Piotr Skowron