

Katowice 28.12.2020.

Znak: KHC-2

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr inż. Anny Urbaniak

pt.:

„Wpływ białka indukowanego prolaktyną na apoptozę komórek raka gruczołu piersiowego wywołaną doksorubicyną”

Wyniki badań opublikowanych w ciągu ostatnich 40 lat udowodniły, że sekrecyjne białko indukowane prolaktyną (PIP), ma istotne znaczenie, zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patologicznych, poprzez udział w proteolizie składników macierzy pozakomórkowej. Białko to posiada aktywność proteazy aspartylowej, której substratem jest fibronektyna. W tkankach zmienionych nowotworowo ekspresja PIP jest zróżnicowana w sposób zależny od typu nowotworu, jego lokalizacji i stopnia zaawansowania rozwoju. Znaczenie kliniczne prowadzenia badań nad PIP wynika m.in. z obserwacji wskazujących na związek między wysoką ekspresją PIP, a zwiększoną podatnością komórek raka gruczołu piersiowego na standardową chemioterapię adjuwantową skutkującą działaniem cytotoksycznym i pro-apoptotycznym oraz wydłużeniem czasu przeżycia wolnego od wznowy i przerzutów. Obniżanie poziomu ekspresji PIP obserwowano w nowotworach gruczołu piersiowego potrójnie negatywnych (ER-, PR-, HER2-), charakteryzujących się zwiększonym stopniem złośliwości, co korelowało z opornością komórek rakowych na leczenie. Wydaje się, że stężenie PIP we krwi obwodowej pacjentek z rakiem gruczołu piersiowego mogłoby być dobrym wskaźnikiem prognostycznym w rokowaniu przebiegu choroby nowotworowej. Z drugiej jednak strony szereg danych wskazujących na działanie pro-proliferacyjne białka PIP, które może być niezależne od obecności receptorów estrogenowych w komórkach nowotworowych stymuluje dalsze badania nad jego rolą w progresji raka gruczołu piersiowego i znaczeniem dla poprawy skuteczności terapii adjuwantowej.

Z powyższych względów, temat badawczy, w którym Doktorantka podjęła próbę oceny znaczenia białka PIP dla oporności komórek raka gruczołu piersiowego na cytotoksyczne działanie leków przeciwnowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem doksorubicyny uznaję za interesujący, aktualny i ważny zarówno dla nauk podstawowych, jak i medycznych.

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 05-01-2021
L.dz. 860

Niewątpliwymi atutami recenzowanej pracy są, po pierwsze: zastosowanie wielu nowoczesnych metod badawczych, takich jak uzyskanie linii komórek z neoekspresją białka PIP oraz linii z zahamowaną ekspresją PIP, uzyskanie i wykorzystanie białka rekombinowanego PIP-LEXSY, zwierzęce modele doświadczalne rozwoju i terapii guzów nowotworowych, hodowla komórkowa, cytometria przepływowa, zaawansowane metody molekularne badania kwasów nukleinowych oraz metody biochemiczne i immunochemiczne badania ekspresji białek.

Po drugie, zaletą pracy jest sposób metodycznego podejścia do problemu poprzez określenie *in vitro* wpływu białka PIP na przeżywalność ludzkich komórek raka gruczołu piersiowego MDA-231/PIP z neoekspresją białka PIP i komórek T47Dpuro/shPIP z wyciszoną ekspresją tego białka oraz, na apoptozę indukowaną wybranymi cytostatykami, tj. dokсорubicyną, 4-hydroksycyklofosfamidem i paklitakselem, a następnie potwierdzenie tych obserwacji *in vivo* w modelu eksperymentalnym myszy bezgranicznych z nowotworami ortotopowymi utworzonymi przez przeszczepione komórki nowotworowe o podanej charakterystyce, leczonych dokсорubicyną. W zastosowanych modelach komórkowych Autorka dokonała oceny przebiegu cyklu komórkowego i aktywności proliferacyjnej badanych komórek raka gruczołu piersiowego. Ponadto zbadała możliwość specyficznego wiązania rekombinowanego białka PIP do błony cytoplazmatycznej komórek nowotworowych, a także wpływ rozpuszczalnego białka PIP na wrażliwość komórek nowotworowych na dokсорubicynę.

Zarówno zastosowane techniki badawcze, jak sposób ich wykorzystania oraz wartościowe wyniki decydują o bardzo dobrej ocenie wartości poznawczej recenzowanej pracy doktorskiej. Zastosowane metody badawcze oraz przeprowadzone etapy badań tworzą spójną całość, co umożliwiło rozwiązanie określonego problemu naukowego i wykazanie, iż białko PIP może bezpośrednio wpływać na odpowiedź raków gruczołu piersiowego na standardową chemioterapię poprzez zwiększenie wrażliwości komórek raka gruczołu piersiowego na apoptozę indukowaną przez leki cytotoksyczne, nie wykazując jednocześnie właściwości pro-proliferacyjnych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Anny Urbaniak powstała w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Całość została logicznie zaplanowana i opisana zrozumiałym językiem. Tytuł rozprawy odzwierciedla przedmiot badania. Praca ma standardowy układ, przyjęty dla tego typu opracowań. Składa się z 9 rozdziałów. Kolejno są to: Streszczenie polsko- i anglojęzyczne, Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz Literatura. Poprzedzona jest spisem treści i wykazem skrótów. W sumie rozprawa liczy 123 strony, ilustrowana jest 19 rozbudowanymi rycinami i 5 tabelami, opiera się na doświadczeniu własnym oraz danych literaturowych zebranych ze 125 pozycji piśmiennictwa.

Nie wnoszę istotnych uwag krytycznych dotyczących strony merytorycznej recenzowanej pracy doktorskiej.

Sugestie i komentarze dotyczące przede wszystkim konstrukcji rozprawy doktorskiej:

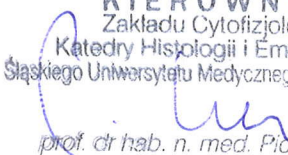
1. Przydatnym uzupełnieniem przedstawionej do recenzji pracy byłby wykaz rycin i tabel, którego można by się spodziewać na początku, po spisie treści i wykazie skrótów, co zawsze ułatwia zapoznanie się z zawartością dużych opracowań.
2. Wstęp pracy dobrze wprowadza czytelnika w problematykę stanowiącą przedmiot zainteresowań Doktorantki, dostarcza informacji o budowie, a także funkcji i występowaniu białka PIP oraz regulacji jego ekspresji w warunkach fizjologicznych i w stanach patologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów gruczołu piersiowego, a następnie o mechanizmach samej apoptozy, jak i pro-apoptotycznego działania doksorubicyny. Zdaniem Recenzenta Wstęp mógłby być wzbogacony o dodatkowy podrozdział, a przynajmniej wyodrębniony akapit kończący tę część rozprawy podsumowujący znaczenie kliniczne badań nad białkiem PAP, aktualny stan badań klinicznych nad PAP (jeśli takie są prowadzone) i perspektywy.
3. Cel pracy powinien być poprzedzony czytelnie wyartykułowaną tezą badawczą, która wynikałaby z założeń przedstawionych w dwóch pierwszych akapitach rozdziału 2. W rozdziale tym Doktorantka przedstawiła „cel ogólny” oraz „cel główny”, a następnie pięć szczegółowych mających doprowadzić do realizacji podstawowego zamierzenia. Cel główny pracy powinien być precyzyjny i jednoznaczny tak, aby rozprawa mogła rozwiązać konkretny problem badawczy. Dlatego wyodrębnienie celu ogólnego i, osobno, celu głównego było zabiegiem trochę niefortunnym, ponieważ właściwy cel badania ulega rozmyciu. Zdaniem Recenzenta, bardziej adekwatny dla recenzowanej pracy byłby cel nazwany przez Autorkę „ogólnym”, wskazujący na zamiar określenia roli białka PIP w oporności komórek nowotworowych na cytotoksyczne działania leków przeciwnowotworowych, niż cel nazwany „głównym”, który wskazuje na równoczesny zamiar określenia roli białka PIP w programowanej śmierci komórek raka gruczołu piersiowego. Taki cel nie odzwierciedla zbyt dokładnie treści pracy, ponieważ nie badano w niej mechanizmu apoptozy, a tylko potwierdzano czy proces ten zachodzi, czy nie. Ponadto określenie „w programowanej śmierci komórek raka gruczołu piersiowego na drodze apoptozy” jest niezręczne i mogłoby być bardziej zwięzłe.
4. W części metodycznej pracy brakuje schematu całego doświadczenia obrazującego najważniejsze jego etapy i przyporządkowane im metody, dającego wyobrażenie o zastosowanej strategii badawczej.

5. W wykazie odczynników brakuje informacji o zastosowanych cytostatykach (postać leku, producent, itp.), co może być związane ze „zniknięciem” treści rozdziału 3.1. Nigdzie też nie znalazłem uzasadnienia, dlaczego w eksperymencie *in vivo* zastosowano tylko doksorubicynę, a zrezygnowano z pozostałych dwóch leków. Niezależnie od przyczyn, dobrze byłoby takie krótkie uzasadnienie podać w tekście pracy. Ponadto na str. 38 (rozdz. 3.7) można było uściślić, że chodzi o szczep *E. coli*.
6. Jak Doktorantka uzasadnia zastosowanie sposobu liczenia komórek Ki67+ i komórek wykazujących pozytywną reakcję TUNEL (str. 66) „w trzech hotspot-miejscach w celu oceny reakcji IHC, wykazujących potencjalnie najwyższe nasilenie reakcji IHC”? Na ile reprezentatywny jest taki pomiar w odniesieniu do całego skrawka tkankowego, czy powierzchni objętej pomiarami?
7. W rozdziale Dyskusja, liczącym 7 stron, Autorka skonfrontowała uzyskane przez siebie wyniki z wynikami innych autorów, wykazując się dobrą znajomością literatury światowej. Dlaczego jednak, wśród 135 pozycji piśmiennictwa, tylko ponad 18% jest najnowszych, tj. zostało opublikowanych w okresie ostatnich 5 lat, natomiast prawie w 67% jest starszych niż 10 lat. Biorąc pod uwagę około 40-letnią historię badań nad białkiem PIP można było zapewne zrezygnować z cytowania zbyt wielu publikacji o podstawowym znaczeniu, ale już historycznym, na korzyść bardziej współczesnych, co zwiększałoby efekt nowości naukowej całego opracowania.
8. Sugerowałbym umieszczenie w formie dodatkowego akapitu pod koniec dyskusji lub nawet jako dodatkowego, rozdziału opisującego ograniczenia przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej. Zamieszczenie takiego rozdziału świadczy zwykle o umiejętności krytycznego spojrzenia na własne dokonania i świadomości występowania braków wynikających m.in. z zastosowanej metodologii. Samokrytycyzm jest też wyrazem dojrzałości naukowej autorów opracowań naukowych.
9. Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia oraz dyskusji wyników Doktorantka wyciągnęła trzy precyzyjne wnioski (str. 115), które odpowiadają na postawione cele. Zdaniem Recenzenta, w świetle uzyskanych wyników dotyczących udziału białka błonowego o masie cząsteczkowej ok. 55 kDa w specyficznym wiązaniu białka PIP, wniosek 3 został sformułowany zbyt ostrożnie.
10. Uwagi redakcyjne: praca została napisana poprawnym i zrozumiałym językiem, i zawiera tylko nieliczne błędy stylistyczne i ortograficzne, co jest jej niewątpliwą zaletą w stosunku do wielu innych opracowań tego typu. Należy jednak unikać określenia „poziom białka”, jako ekwiwalentnego w stosunku do „ekspresji” lub „stężenia” (np. Ryc. 8B, str. 75).

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa mgr inż. Anny Urbaniak jest wartościową pracą naukową wykonaną z zastosowaniem nowoczesnych metod badawczych, podejmuje aktualny temat i zawiera elementy nowości naukowej. Rozprawa spełnia ustawowe wymagania dla prac doktorskich, przede wszystkim stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje wiedzę teoretyczną kandydatki w reprezentowanej przez nią dyscyplinie naukowej, a także zaawansowane umiejętności prowadzenia pracy naukowej.

Na tej podstawie zwracam się z wnioskiem do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Anny Urbaniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoką jakość i duży zakres przeprowadzonych badań oraz zaangażowanie Autorki w ich wykonanie stawiam wniosek o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK
Zakładu Cytofizjologii
Katedry Histologii i Embriologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

prof. dr hab. n. med. Piotr Czekał