Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Prof. dr hab. Wanda M. Krajewska

Katedra Cytobiochemii

Łódź, 2 grudnia 2014 roku

O C E N A

pracy doktorskiej mgra Michała Kiełbika

pt. *Ocena bezpośredniego działania donorów tlenku azotu na wybrane cechy nowotworowe komórek linii raka jajnika*

Tematyka pracy doktorskiej mgra Michała Kiełbika znakomicie wpisuje się w nurt współczesnych badań nad poszukiwaniem nowych strategii terapeutycznych chorób nowotworowych. Poszukiwania te, będące obiektem badań podstawowych i klinicznych wielu zespołów badawczych na całym świecie, mają na celu zarówno zwiększenie skuteczności, jak i zmniejszenie niepożądanych efektów ubocznych stosowanych terapii przeciwnowotworowych. Nie ulega wątpliwości, iż tematyka podjęta w pracy doktorskiej jest uzasadniona, a biorąc pod uwagę złożoność mechanizmów transformacji nowotworowej oraz jej specyfikę w kontekście określonego typu komórek i tkanek, również bardzo ambitna.

Pomimo, że nowotwory jajnika nie są najczęstszym typem nowotworów wśród kobiet, to są one przyczyną największej liczby zgonów spośród wszystkich nowotworów układu rozrodczego. Niska skuteczność leczenia raka jajnika nie wynika wyłącznie z faktu, że diagnozowany jest on dopiero, gdy choroba charakteryzuje się już wysokim stopniem zaawansowania klinicznego, ale również z faktu, że komórki

nowotworowe jajnika nabywają oporności na standardowo stosowane chemoterapeutyki. Dlatego też poprawa skuteczności leczenia raka jajnika uzależniona jest od zidentyfikowania nowych, bardziej efektywnych podejść terapeutycznych.

Oceniana praca przygotowana została w formie tradycyjnej dla rozpraw doktorskich w zakresie nauk przyrodniczych. Otwiera ją rzetelny przegląd literatury, w ramach którego przedstawiono aktualny stan wiedzy odnośnie do zagadnień będących przedmiotem badań. Scharakteryzowano nowotwory jajnika w aspekcie medycznym, tj. diagnostyki, klasyfikacji i stosowanych terapii. W kolejnych rozdziałach omówiono szlaki sygnalizacyjne z udziałem białka STAT3 i kinazy Akt/PKB, których zaburzenia mają miejsce w komórkach stransformowanych, następnie czynniki wzrostu i cytokiny oraz proteinazy sprzyjające nabywaniu fenotypu złośliwego i tworzeniu przerzutów, tj. transformujący czynnik wzrostu β (TGFβ), czynnik martwicy nowotworu α (TGFα), interleukiny typu 6 i 10 (IL-6, IL-10), oraz metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs). Tę część pracy kończy omówienie tlenku azotu oraz jego biologicznej roli i mechanizmów działania w komórkach prawidłowych i nowotworowych, a także donorów tlenku azotu i ich potencjału terapeutycznego. Tak szerokie ujęcie wstępu teoretycznego stanowi bardzo dobre wprowadzenie i uzasadnienie podjętej tematyki badawczej.
Prosiłabym o wyjaśnienie określenia, cyt.: „receptor dla kinaz tyrozynowych", które znalazło się na rycinie 1, a także w tekście na str. 12 i 15. Chodzi chyba o receptory przezbłonowe o aktywności kinazy tyrozynowej ich domeny cytoplazmatycznej. Ponadto tytuł rozdziału 1.2.2., tj. „Serynowo-treoninowa kinaza białkowa" jest zbyt mało informatywny. Kinaza Akt będąca przedmiotem tego rozdziału nie jest jedyną kinazą serynowo-treoninową w komórce. Angiogeneza to jest rozrost istniejących naczyń krwionośnych, a nie tworzenie nowych naczyń krwionośnych czemu odpowiada pojęcie waskulogeneza (str. 16). Białka SMAD to zidentyfikowane u kręgowców homologi białka Sma *Caenorhabditis elegans* i białka MAD *Drosophila melanogaster*, a nie połączenie homologicznych białek Sma i Mad (str. 20). Przejęzyczeniem jest chyba również stwierdzenie, że histony, topoizomerazy i polimerazy DNA to jądrowe białka receptorowe (str. 31).

Celem pracy było poszukiwanie odpowiedzi na pytanie o aktywność przeciwnowotworową tlenku azotu w przypadku raka jajnika.

Badaniami objęto dwa donory tlenku azotu, tj. kompleks sperminy z NO (SPER/NO) oraz dietylenotriaminy z NO (DETA/NO), zdolne do spontanicznego uwalniania tlenku azotu w roztworach fizjologicznych i charakteryzujące się stałą ilością uwalnianego NO, ale odmiennym czasem półtrwania. Modelem badawczym były dwie linie komórek raka jajnika, tj. OVCAR-3 oraz SK-OV-3 różniące się między innymi stopniem zaawansowania procesu nowotworowego. Jako komórki nienowotworowe zastosowano linię HEK 293.

Zakres przeprowadzonych badań jest imponujący. Do realizacji założonego celu pracy wykorzystano szerokie spektrum technik badawczych. Rozdział *Materiały i metody* zawiera właściwy opis metod i precyzuje szczegóły stosowanych podejść metodycznych. Pokazuje, że przeprowadzono rozległy zakres badań za pomocą właściwych, logicznie uzupełniających się technik laboratoryjnych. Żywotność komórek oceniano testem MTT, WST-8, LDH i z jodkiem propidyny, a apoptozę wykorzystując cytometrię przepływową pozwalającą na pomiar potencjału błony mitochondrialnej i obecność fosfatydyloseryny na powierzchni komórek apoptotycznych oraz poprzez aktywność kaspazy-3. Ekspresję i aktywację wybranych białek identyfikowano techniką RT-PCR oraz metodą Western blot i chemiluminescencji, a poziom uwalniania czynników wzrostu, metaloproteinaz i cytokin testem ELISA. Aktywność metaloproteinaz oceniano za pomocą zymografii żelowej.

Wyniki badań zaprezentowano w formie 27 złożonych rycin oraz jednego zestawienia tabelarycznego. Wyniki są bardzo dobrze i przejrzyście udokumentowane i opisane, a ich czytelność umożliwia ich interpretację (zgodnie z przyjętą numeracją rozdział *Wyniki* powinna rozpoczynać rycina 6, a nie 4 i kończyć rycina 32, a nie 30). Oceniono cytotoksyczność badanych donorów tlenku azotu SPER/NO i DETA/NO wobec komórek raka jajnika, wpływ na indukcję apoptozy/nekrozy, aktywację białka sygnałowego STAT 3 i kinazy Akt/PKB oraz aktywność proteasomu, uwalnianie czynników wzrostu VEGF-A i TGFβ oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9, aktywność metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, produkcję IL-6, a także na uwrażliwienie komórek nowotworowych na cisplatynę.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że wpływ donorów tlenku azotu na żywotność komórek czy indukcję apoptozy weryfikowano za pomocą kilku podejść metodycznych. Chociaż uzyskiwane wyniki wykazały pewne rozbieżności, Doktorant interpretował je w sposób kompetentny i przekonujący. Mam następujące uwagi:

- str. 69, donory tlenku azotu dodawano chyba do hodowli, a nie do komórek,
- str. 84, interpretując wyniki w odniesieniu do czasu hodowli z donorami NO należało się chyba odwołać do ryciny 14 a nie 15,
- str. 85, na rycinie 14 nie zaznaczono czasu hodowli w obecności donorów NO,

a przede wszystkim

- czy stężenia cisplatyny stosowane w badaniach odpowiadają stężeniom osiąganym *in vivo*,
- czy znane jest zróżnicowanie genotypowe komórek OVCAR-3 i SK-OV-3, co mogłoby tłumaczyć obserwowane różnice ich właściwości w obecności NO.

Rzeczowa i obszerna dyskusja, którą kończy podsumowanie wyników ujęte w 11 punktach i ostatecznie jeden wniosek jeszcze raz potwierdza właściwą interpretację wyników własnych i doskonałą znajomość literatury przedmiotu.

W pracy udowodniono, że *in vitro* donory tlenku azotu hamują żywotność komórek raka jajnika oraz obniżają ich zdolność do inwazji i tworzenia przerzutów, a także uwrażliwiają je na standardowo stosowaną w terapii przeciwnowotworowej cisplatynę. Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki wskazują nie tylko na potencjalną rolę tlenku azotu w terapii raka jajnika, ale również na ogromną złożoność procesów i odmienność ich mechanizmów w komórkach nowotworów wywodzących się nawet z tego samego organu. W świetle zaprezentowanych w pracy doktorskiej wyników badań oraz danych literaturowych wskazujących, że pro- czy antynowotworowe efekty tlenku azotu zależą od jego stężenia, interesującym byłoby przybliżenie przez Doktoranta aktualnego stanu wiedzy odnośnie do raka jajnika w kontekście ekspresji syntaz tlenku azotu czy poziomu nitrotyrozyny jako jego markera, a biorąc pod uwagę fakt, że nowotwory jajnika należą do nowotworów tkanek hormonozależnych, udziału hormonów steroidowych w syntezie tlenku azotu,

Recenzowana rozprawa doktorska licząca 185 stron, w tym 415 pozycji literaturowych (w pracy naukowej zbyteczne wydaje się cytowanie podręczników,

poz. 114) przygotowana została z dużą starannością zarówno pod względem językowym, stylistycznym, jak i edytorskim. Przejrzystość rozprawy wzbogaca wykaz stosowanych skrótów i symboli oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Autor nie uniknął żargonu laboratoryjnego, np. cyt. „membrany...wolne miejsca *wyblokowano*" (str. 58, 61, 66). Brak jest konsekwencji w rozwinięciu akronimu NADH i NADPH. Zalecane z punktu widzenia nazewnictwa chemicznego rozwinięcie *dinukleotyd*...używane jest wymiennie z *dwunukleotyd* ... (np. wykaz skrótów, str. 31). Skrót PI3K nie odpowiada kinazie 3-fosfatydyloinozytolu, co wskazywałoby, że substratem jest 3-fosfotydyloinozytol (wykaz skrótów, str. 1, 12, 13). Rozwinięciem tego akronimu jest 3-kinaza fosfotydyloinozytolu, co wskazuje, że fosforylacja zachodzi w pozycji trzeciej fosfotydyloinozytolu. Zgodnie z przyjętymi zasadami geny zapisuje się kursywą, np. *BRCA1*, *PTEN*, *STAT3* (str. 1, 4, 11), co pozwala odróżniać je od kodowanych przez nie białek, odpowiednio BRCA1, PTEN, STAT3.

Ocena końcowa

Praca doktorska mgra Michała Kiełbika pt. *Ocena bezpośredniego działania donorów tlenku azotu na wybrane cechy nowotworowe komórek linii raka jajnika* niewątpliwie wnosi nowe dane dotyczące potencjalnej roli przeciwnowotworowej tlenku azotu. O wartości poznawczej uzyskanych w pracy doktorskiej wyników świadczy fakt ich opublikowania w prestiżowych, indeksowanych czasopismach, tj. *Nitric Oxide* (2013) o 5-letnim współczynniku oddziaływania ponad 3,5 oraz *Anti-Cancer Drug* (2014) o 5-letnim IF blisko 2,2. Wyniki zawarte w pracy doktorskiej prezentowane były również w formie doniesień zjazdowych na czterech konferencjach międzynarodowych.

Rozprawę doktorską mgra Michała Kiełbika oceniam w pełni pozytywnie, jako spełniającą wymogi art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami. Zwracam się zatem do Komisji ds. Przyjmowania i Przeprowadzania Obron Rozpraw Doktorskich i Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi o przyjęcie pracy i dopuszczenie mgra Michała Kiełbika do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wartość naukową i jakość opracowania rozprawy stawiam wniosek o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.