



Prof. dr hab. Alicja Ratuszna

Katowice, 2016-10-23

Recenzja pracy doktorskiej mgr Justyny Plonki - Czerw

pt. *Ekspresja metaloproteinaz (MMPs) i ich tkankowych inhibitorów (TIMPs)*

*w komórkach nowotworowych gruczołu piersiowego oraz w prawidłowych komórkach*

*mikrośrodowiska nowotworu po terapii fotodynamicznej in vitro*

*Przedstawiona do recenzji praca doktorska wykonana została w Zakładzie Biologii Komórki, na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem dr hab. n. med. Małgorzaty Latochy.*

*W przedstawionej do recenzji pracy podjęto zadanie określenia wpływu terapii fotodynamicznej (PDT) na ekspresję wybranych metaloproteinaz oraz ich tkankowych inhibitorów w komórkach nowotworowych gruczołu piersiowego, w kokulturach komórek nowotworowych z prawidłowymi fibroblastami oraz w hodowlach prawidłowych fibroblastów, stymulowanych czynnikami wydzielanymi przez komórki nowotworowe gruczołu piersiowego poddanych wcześniej PDT.*

*Praca ma typowy układ, składa się z 8 rozdziałów: Wstęp, Założenia i cele pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Piśmiennictwo oraz Streszczenia (w języku polskim i angielskim). Na początku pracy dołączono wykaz stosowanych skrótów, tabel i rycin.*



### Omówienie recenzowanej pracy

We „Wstępie” Autorka bardzo wnikliwie scharakteryzowała, opierając się na dostępnej literaturze, metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMPs) i ich tkankowych inhibitorów (TIMPs) oraz ich znaczenia w przebiegu procesu nowotworzenia (regulacji proliferacji komórek nowotworowych, apoptozy, procesu angiogenezy, regulacji odpowiedzi immunologicznej). Jeśli w procesie rozwoju nowotworu istnieje korelacja między podwyższoną aktywnością metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej i ich inhibitorów a rozmiarem guza pierwotnego, inwazyjnym wzrostem oraz odległymi nawet przerzutami, to wydaje się, że MMPs i TIMPs można by wykorzystać jako markery w diagnostyce czy w prognozowaniu rozwoju choroby. Czynnikiem, który może wpływać na obniżenie ekspresji MMPs oraz TIMPs wydaje się być terapia fotodynamiczna (PDT). Stąd ukierunkowanie badań przedstawionych w niniejszej pracy na zastosowanie PDT jako czynnika hamującego tę ekspresję. Dlatego też opisowi podstaw terapii fotodynamicznej (PDT) poświęcono w tej rozprawie sporo miejsca.

W kolejnym rozdziale „Założenia i cele pracy” Doktorantka zdefiniowała główny cel swoich badań, którymi jest ocena wpływu PDT na ekspresję wybranych metaloproteinaiz macierzy pozakomórkowej i ich tkankowych inhibitorów, na przykładzie raka piersi.

W rozdziale zatytułowanym „Materiał i Metody” Autorka rozprawy szczegółowo opisuje zastosowane w pracy badawczej metody oraz aparaturę i użyte odczynniki. Praca ma charakter eksperymentalny i została przeprowadzona w warunkach *in vitro* na komórkach raka sutka linii MCF-7 i T-47D, charakteryzującymi się stosunkowo niską inwazyjnością oraz obecnością receptorów dla estrogenów i progesteronu oraz na komórkach raka sutka linii MDA-MB-231 o wysokiej inwazyjności oraz braku receptorów dla estrogenów i progesteronu i na komórkach prawidłowych fibroblastach. W kolejnych podrozdziałach opisane zostały poszczególne etapy przeprowadzonych eksperymentów: wpływu terapii fotodynamicznej *in vitro* na komórki, w którym zastosowano fotouczulacz Fotolon (kompleks chloryny e6), ocenę wpływu PDT na żywotność komórek nowotworowych przy zastosowaniu promieniowania o danej długości fali (długość fali tu wynosiła 662 nm) o różnej dawce podanego fotouczulacza czy mocy zastosowanego promieniowania laserowego. Ocenę żywotności komórek oceniono standardowym testem kolometrycznym (WST-1), ilość ekstrahowanego RNA określono metodą spektrofotometryczną, a analizę ilościową ekspresji genów MMP i TIMP oraz genu metabo-



licznego 18S rRNA wykonano techniką RT-QPCR. Otrzymane rozkłady danych z każdej z prób poddano analizie statystycznej z użyciem testów parametrycznych, wykonanych przy pomocy programu Statistica 10.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka w sposób obszerny opisuje uzyskane rezultaty. Podane zostały wyniki badań żywotności komórek nowotworów inwazyjnych i nieinwazyjnych, po zastosowaniu PDT, ekspresje genów kodujących w hodowlach kontrolnych i po zastosowaniu PDT. Podobne typy testów wykonane zostały dla kokultur i dla fibroblastów. Uzyskane wyniki przedstawione zostały w postaci tabel i wykresów (diagramy), co bardzo ułatwiło ich odczyt i porównanie.

W rozdziale „Dyskusja” Autorka odnosi się do uzyskanych przez siebie wyników eksperymentalnych, porównując je z aktualnymi doniesieniami naukowymi.

Bibliografia dołączona do pracy obejmuje 112 pozycji adekwatnych do treści pracy, do których odniesienia poprawnie przypisano w tekście. Cytowane prace pochodzą z ostatnich 15 lat, a to dlatego, że terapia PDT jest stosunkowo nową metodą stosowaną w leczeniu nowotworów. Brakuje mi tu prac Doktorantki, bo przecież przedstawiony w rozprawie materiał doświadczalny i uzyskane wyniki są, w mojej opinii, wystarczające do ich opublikowania w dobrym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

#### Opinia pracy

W przedstawionej pracy doktorskiej podjęty został bardzo aktualny problem, poszukiwania skutecznych metod terapii nowotworów. Od wielu lat, w zespołach naukowych, w tym też i w Polsce, prowadzi się badania nad zrozumieniem mechanizmu powstawania komórek nowotworowych, ich wzrostu i przerzutowania. Poznanie i zrozumienie procesów biochemicznych jakie zachodzą w komórce nowotworowej, a także w jej mikrośrodowisku pozwoli na skuteczne znalezienie metod zahamowania tych procesów i na zniszczenie patologicznych komórek. Stąd wybór tematyki wydaje się być trafny.

Badano rolę ekspresji genów MMPs i TIMPs dla komórek raka sutka MCF-7 i T-47D (nisko-inwazyjne), MDA-MB-231 (wysoko-inwazyjne) oraz fibroblastów HFF-1, które w określonych sytuacjach są zaangażowane w proces wzrostu, inwazji i w tworzeniu odległych przerzutów (tu raka pier-



si) nie tylko w samych komórkach nowotworowych ale i w prawidłowych fibroblastach, współtworzących jego mikrośrodowisko. Doktorantka założyła więc, że terapia PDT, która zaczyna być coraz częściej stosowana jako terapia alternatywna obok chemio- i radioterapii, może obniżyć ekspresję wzrostu komórek nowotworowych i w efekcie zablokować tak ich wzrost jak i przerzutowanie. W pracy przedstawiono wyniki badań *in vitro* dla określonych warunków: dla wybranego fotouczulacza (nie wiem czy najlepszego dla badanych linii raka piersi), jego stężenia w podanej dawce, długości światła i mocy dawki promieniowania pobudzającego. Uzyskane wyniki nie wskazują na przełom, bardzo ostrożnie sformułowany wniosek mówi, że „w zastosowanych warunkach eksperymentalnych, obniżenie ekspresji większości MMPs i TIMPs po PDT nie wpłynęło na wzrost inwazyjności badanych komórek rakowych”.

Na taki wynik w pierwszej kolejności może mieć wpływ tak wybór Fotolonu (substancji nie dopuszczonej do stosowania w Polsce), jak i warunków przeprowadzenia badań PDT *in vitro*. W pracy nie przedstawiono własnych pomiarów (potwierzeń), że zastosowana długość światła mieści się w maksimum absorpcji dla Fotolonu (rozumiem, że Autorka wybór lasera emitującego światło o długości 662 nm dokonała na podstawie danych literaturowych, opisujących własności tego fotouczulacza), a przecież odpowiedni dobór tego parametru ma decydujący wpływ na skuteczność zastosowanej metody. Brak mi też pewnych fizycznych aspektów stosowania PDT, którego skuteczność zależy od tego który mechanizm fotodynamiczny zostaje uruchomiony: czy poprzez wolne rodniki (ROS) czy aktywność tlenu singletowego. Wydajność każdego z tych mechanizmów można wyznaczyć eksperymentalnie i wtedy dokonać wyboru odpowiedniego fotouczulacza, zależnie od środowiska tlenowego w badanych komórkach nowotworowych.

Wartością pracy jest szerokie omówienie procesów ekspresji wybranych genów metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej oraz ich tkankowych inhibitorów w komórkach nowotworowych gruczołu piersiowego oraz w prawidłowych komórkach mikrośrodowiska nowotworu.

### Konkluzja

Recenzowana rozprawa doktorska pani Justyny Płonki Czerw wpisuje się do aktualnych kierunków badawczych współczesnej medycyny doświadczalnej i może mieć istotne przełożenie na przyszłe kierunki badań z zastosowaniem terapii fotodynamicznej. Tak podjęta tematyka jak i sposób pre-



zentacji uzyskanych wyników i ich interpretacja sprawia, że recenzowana praca doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i na tej podstawie wnioskuję do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o dopuszczenie mgr Justyny Płonki - Czerw do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Rejzner