



UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Recenzja rozprawy doktorskiej

"Ekspresja metaloproteinaz (MMPs) i ich tkankowych inhibitorów (TIMPs) w komórkach nowotworowych gruczolu piersiowego oraz w prawidłowych mikrośrodowiska nowotworu po terapii fotodynamicznej *in vitro*."

mgr Justyna Płonka-Czerw

promotor dr hab. n. med. Małgorzata Latocha

Rak piersi jest jednym z najczęściej rozwijających się nowotworów złośliwych u kobiet. Już w XVII wp.n.e. Egipcjanin Ebres opisał siedem przypadków guzów piersi u kobiet i jeden przypadek u mężczyzny. Nowotwór piersi należał do chorób nieuleczalnych. Dopiero wiek XX i XXI przyniósł znaczny postęp w leczeniu chorób onkologicznych, w tym także gruczolu sutkowego. Szanse na wyleczenie choroby nowotworowej ciągle rosną. Jest to wynik coraz lepszego zrozumienia mechanizmów powstawania i rozwoju nowotworów. Mimo jednak ogromnego postępu, zarówno we wczesnej diagnostyce ale również w leczeniu tego nowotworu, ciągle obserwuje się brak skutecznych sposobów, które pozwoliłyby w znacznym stopniu obniżyć wysoki wskaźnik śmiertelności. Dostępne obecnie metody leczenia są bardzo często nieskuteczne. Ciągle poszukuje się nowych, bardziej efektywnych i mniej toksycznych metod walki z tą można powiedzieć chorobą „cywilizacyjną” XXI wieku. Jednym z nich jest terapia fotodynamiczna (PDT), która bardzo często stanowi uzupełnienie chemioterapii, radioterapii czy immunoterapii nowotworów pęcherza moczowego czy skóry. Ostatnio rozpatruje się możliwość wprowadzenia PDT w leczeniu uzupełniającym stosowanych obecnie sposobów leczenia raka piersi, a nawet jako samodzielną metodę walki z tym nowotworem.

Nowotwór aby się rozwijać musi oddziaływać na swoje otoczenie, tworząc warunki sprzyjające swojemu dalszemu rozwojowi. Mikrośrodowisko jest pozornie niesprzyjające rozwijającemu się guzowi (ubogie w tlen, składniki odżywcze, niskie pH). Ważnym elementem mikrośrodowiska nowotworu jest macierz międzykomórkowa (ECM), której komórki efektywnie wspierają jego wzrost poprzez wydzielanie metaloproteina (MMP) i wytwarzanie różnych czynników wzrostowych. Ze względu na rolę jaką pełni ECM w progresji i rozprzestrzenianiu się

zmian nowotworowych coraz więcej uwagi poświęca się zjawiskom zachodzącym w otoczeniu komórek nowotworowych przy opracowaniu lub modyfikacji metod przeciwnowotworowych.

Zasadne zatem było podjęcie przez doktorantkę badań, których celem było wyjaśnienie i ocena wpływu terapii fotodynamicznej na ekspresję wybranych metaloproteinaz i ich inhibitorów nie tylko na wybranych liniach komórkowych raka gruczołu sutkowego w odniesieniu do linii prawidłowych fibroblastów, ale również w kokulturach komórek nowotworowych z prawidłowymi i w prawidłowych fibroblastach stymulowanych pożywkami zebranymi z hodowli komórek nowotworowych poddanych wcześniej PDT. Podjęcie się przez doktorantkę takiego profilu badań uważam za nowatorskie. Do tej pory prowadzonych było niewiele badań o takiej tematyce. Indukowano terapią fotodynamiczną ekspresję metaloproteinazy 3, która w przeciwieństwie jednak do innych enzymów z tej rodziny ma charakter ochronny w stosunku do komórek (Jurczyszyn 2010). Metaloproteinazy 7 użyto w celu uzyskania wysokiej selektywności i efektywności terapii fotodynamicznej (Zheng i wsp. 2007). Modulowano i oceniano także aktywność wybranych MMP i ich inhibitorów indukowaną terapią fotodynamiczną (Rozprawy doktorskie Uniwersytet Wrocławski).

Przedłożona mi do recenzji praca liczy 134 strony i jest podzielona w sposób odpowiadający rozprawom doktorskim.

We *Wstępie* liczącym 29 stron autorka szeroko opisuje charakterystykę, funkcję, strukturę molekularną i regulację ekspresji genów MMP. Dodatkowo omawia znaczenie metaloproteinaz i ich inhibitorów w przebiegu procesu nowotworzenia i rozwoju raka piersi. Opisuje na podstawie zebranej literatury mechanizmy terapii fotodynamicznej jej oddziaływanie na tkankę nowotworową oraz zastosowanie PDT do leczenia raka piersi. Należy także podkreślić, że *Wstęp* pracy jest wzbogacony w liczne schematy, które ilustrują opisywane mechanizmy. Należałoby może podkreślić przy omawianiu typów reakcji PDT, że mogą one zachodzić jednocześnie. Proszę jednak nie traktować tego jako zarzut, czy błąd merytoryczny a jedynie wskazówkę. Ta część pracy jest doskonałym wprowadzeniem w część doświadczalną rozprawy.

W rozdziale „*Założenia i cele pracy*” autorka krótko uzasadnia podjęte przez nią badania i formułuje jasno sprecyzowane cele. Cel pracy jaki wyznaczyła sobie doktorantka jest właściwy. Na uwagę zasługuje również szczegółowy podział badań na etapy.

Material i metody doktorantka opisuje poprawnie ale nie do końca precyzyjnie i jasno. W podrozdziale III.2 autorka nie podaje dokładnego czasu naświetlania. W podrozdziale III.2.1. nie podaje, czy po naświetlaniu komórek zmieniano płyn na wolny od fotouczulacza. Uważam jednak, że są to tylko drobne uchybienia. Eksperymenty są obrazowane przejrzystymi schematami i fotografiami (ryc.5, ryc.6). Obiektem badań były linie komórkowe raka gruczołu sutkowego ER

dotatnie i ujemne. Trochę szkoda, że doktorantka nie pokusiła się o sprawdzenie, czy linie komórkowe raka gruczołu sutkowego, na których prowadzone były doświadczenia rzeczywiście wykazywały lub nie ekspresję ER. Oparła się tylko na charakterystyce linii podanych w opisie z ATCC. Sugeruje, że dobrze byłoby sprawdzić nadekspresję tych receptorów lub ich brak metodą immunocytochemiczną lub western blot przed opublikowaniem wyników. Wydaje mi się również, że doktorantka powinna użyć jeszcze jednej metody oceniającej efekt cytotoksyczny PDT względem komórek badanych np. testu SRB, który określa całkowitą ilość białek w komórkach.


Przeprowadzone doświadczenia zaowocowały wieloma oryginalnymi i interesującymi wynikami. *Wyniki* przedstawiono w postaci wykresów i tabel, są jasne i nie budzą zastrzeżeń. Bardzo dobra jakość przedstawionej dokumentacji świadczy, że doktorantka w sposób biegły posługuje się stosowanymi w rozprawie metodami i swobodnie korzysta z aparatury badawczej.

Dyskusja jest trudną próbą konfrontacji przez doktorantkę uzyskanych przez siebie wyników z danymi z piśmiennictwa. Niestety niewiele jest danych literaturowych, w których ocenia się wpływ terapii fotodynamicznej nie bezpośrednio na komórki nowotworowe, ale na ich otoczenie. Dlatego może w pierwszej części dyskusji doktorantka przytacza literaturę dotyczącą możliwości efektywnego wykorzystania terapii fotodynamicznej w leczeniu raka gruczołu sutkowego. Druga część dyskusji to precyzyjne omówienie uzyskanych przez doktorantkę własnych bardzo interesujących wyników. W kilku zdaniach podsumowujących dyskusję autorka słusznie podkreśla, że powyższe wyniki zostały uzyskane w warunkach *in vitro* i nie można ich jednoznacznie odnieść do warunków *in vivo*. Zgadzam się z doktorantką, że uzyskane przez nią rezultaty stanowią jedynie punkt wyjścia, jednak bardzo istotny, do prowadzenia dalszych, bardziej szczegółowych badań, które powinny uwzględnić także oddziaływania komórek nowotworowych z innymi komórkami mikrośrodowiska nowotworu.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka formułuje 7 wniosków. Wydaje mi się, że ostatni wniosek jest bardzo ostrożny i trochę dla mnie niezrozumiały. Autorka na podstawie uzyskanych wyników mogłaby się pokusić o bardziej odważne sugestie w tym miejscu.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Justyny Płonki-Czerw budzi moje uznanie przede wszystkim ze względu na podjęcie tak bardzo odmiennego i nowatorskiego nurtu badawczego dotyczącego wpływu terapii fotodynamicznej na otoczenie nowotworu i związanej z nim progresji tego procesu. W mojej opinii przedstawiona mi do recenzji praca jest bez wątpienia osiągnięciem naukowym i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim art. 14 i 15 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląskiego Uniwersytetu

Medycznego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Justyny Płonki-Czerw do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uniwersytet Medyczny im. M. Kopernika
KATEDRA I ZAKŁAD
BIOCHEMII LEKARSKIEJ
profesor nadzwyczajny

dr hab. Jolanta Sączko