

Ocena pracy doktorskiej lek. Katarzyny Jędrzejowskiej pt. „Wpływ cisplatyny i doksorubicyny na układ prooksydacyjno/antyoksydacyjny oraz ekspresję białka p53 w komórkach gruczolakoraka płuc *in vitro*”



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Nowotwory płuc stanowią grupę najczęściej występujących nowotworów złośliwych u mężczyzn, a wśród kobiet rak płuc zajmuje trzecie miejsce pod względem zachorowalności. Ryzyko zachorowania na raka płuc wzrasta wraz z wiekiem. Analizując dane pochodzące z lat 1970 - 2004 obserwuje się stały wzrost częstości zachorowań na raka płuc wśród ludności Polski – u mężczyzn 2-krotny, u kobiet 4-krotny.

Rak płuc to heterogenna grupa nowotworów obejmująca raka drobnokomórkowego oraz raka niedrobnokomórkowego. Wśród raków niedrobnokomórkowych wyróżnia się gruczolakoraka płuc, wielkokomórkowego raka płuc oraz płaskonabłonkowego raka płuc, a ostatnio coraz częściej stosowane są modyfikacje tej klasyfikacji, uwzględniające wyniki badań cytologicznych, immunohistochemicznych i molekularnych oraz ocenę radiologiczną nowotworu.

Wybór metody leczenia raka płuc zależy od wielu czynników, a wśród metod leczenia należy wymienić leczenie chirurgiczne, radioterapię oraz chemioterapię adjuwantową. Wśród leków cytostatycznych, charakteryzującą się dużą cytotoksycznością cisplatyna jest najczęściej stosowana w leczeniu raka niedrobnokomórkowego. Doksorubicyna jest szeroko stosowanym lekiem cytostatycznym z grupy antybiotyków antracyklinowych, który zaburza transkrypcję DNA komórki.

Jednym z czynników mogących zwiększać ryzyko wystąpienia tego typu nowotworu jest dieta uboga w składniki o działaniu przeciwutleniającym, a jednym z mechanizmów prowadzącym do procesów karcinogenezy jest szkodliwy wpływ reaktywnych form tlenu. Proces zaburzenia równowagi pomiędzy ich powstawaniem, a usuwaniem oraz naprawianiem wywołanych przez nie uszkodzeń to stres oksydacyjny, którego markerami są zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych - głównie dysmutazy ponadtlenkowej i jej izoenzymów, katalazy, peroksydazy glutationowej, reduktazy glutationowej, transferazy S-glutationowej, jak również powstający w procesie peroksydacji lipidów dialdehyd malonowy. Białko p53 reguluje cykl komórkowy, umożliwiając naprawę uszkodzonego DNA komórki lub kierując komórkę na drogę śmierci komórkowej.

Wydział Lekarski

Katedra Fizjologii

ul. Grzegorzewska 16

PL 31-531 Kraków

tel. +48(12) 421 10 06

+48(12) 619 96 30

fax +48(12) 422 20 14

fizjologia@cm-uj.krakow.pl

W 2010 roku, rak płuca był w Polsce najczęstszą przyczyną zgonów spowodowanych nowotworami złośliwymi u obu płci. Wyjaśnianie zależności pomiędzy różnymi czynnikami mogącymi brać udział w powstawaniu, progresji oraz skutecznej terapii nowotworów jest dążeniem wielu badaczy zajmujących się tymi problemami. Dlatego też przedłożoną mi do oceny rozprawę uważam za niezwykle istotny wkład do badań klinicznych. Wybór takiego tematu przez Doktorantkę uważam za bardzo aktualny, nowoczesny i głęboko uzasadniony.

Przedstawiona mi do oceny dysertacja liczy 73 strony, posiada typowy dla tego rodzaju prac układ redakcyjny, zawiera wykaz skrótów, spis tabel i rycin, szeroko rozbudowany wstęp, cel pracy, materiał i metody badań własnych, wyniki, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo liczące 130 pozycji oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Praca pochodzi z Zakładu Żywienia Człowieka Katedry Dietetyki Wydziału Zdrowia Publicznego w Bytomiu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, wykonana pod kierownictwem dr hab. n. med. Renaty Polaniak, autorytetu w dziedzinie biochemii klinicznej oraz szeroko pojętej diagnostyki laboratoryjnej oraz fizjologii komórki, a także cenionego badacza, uznanego w kraju oraz rozpoznawalnego na forum międzynarodowym.

W rozbudowanym, logicznie zaplanowanym wstępie Doktorantka przypomina szczegółowo wyniki dotychczasowych obserwacji na temat epidemiologii raka płuca, leczenia niedrobnokomórkowego raka płuca, znaczenia onkogenów i genów supresorowych w raku płuca, leków cytostatycznych o różnym mechanizmie działania oraz stresu oksydacyjnego w komórce. Zwraca uwagę na niejasności i kontrowersje w literaturze tego tematu. Autorka głęboko wnika w fizjologię tematu, wzbogacając treść informacjami na temat nowych badań, co osobiście dla recenzenta jest szczególnie cennym. Jasno przedstawia znaczenie szeregu patologii, jakie mogą znaleźć się w omawianych procesach peroksydacji lipidów błon komórkowych w przebiegu transformacji nowotworowej. Lektura tego rozdziału świadczy o rzetelnej znajomości przez Autorkę współczesnego piśmiennictwa dotyczącego poruszanych zagadnień. Dobór pozycji literatury uważam za właściwy, z satysfakcją stwierdzam, że większość pozycji piśmiennictwa pochodzi z ostatniej dekady oraz uwzględnia najnowsze doniesienia. Zaletą tej części pracy są staranne opisy i wysoki poziom edytorski rycin.

W rozdziale nt. celu pracy zwięźle, na jednej stronie, Autorka przedstawia założenia pracy, a były to: (1) ocena aktywności i stężenia parametrów układu

Wydział Lekarski

Katedra Fizjologii

ul. Grzegorzewska 16

PL 31-531 Kraków

tel. +48(12) 421 10 06

+48(12) 619 96 30

fax +48(12) 422 20 14

fizjologia@cm-uj.krakow.pl



prooksydacyjno/antyoksydacyjnego w komórkach ludzkiego gruczolaka płuca linii A549 *in vitro* pod wpływem zastosowanych dawek i przedziału czasowego badanych cytostatyków; (2) Ocena stężenia dialdehydu malonowego w komórkach ludzkiego gruczolaka płuca linii A 549 *in vitro* pod wpływem działania cisplatyny i doksorubicyny, (3) Ocena stężenia białka p53 w komórkach ludzkiego gruczolaka płuca linii A 549 *in vitro* pod wpływem działania cisplatyny i doksorubicyny.

W rozprawie wykorzystano do badań materiał pochodzący z hodowli komórek gruczolaka płuca linii A549 *in vitro*. Hodowlę komórkową prowadzono na podłożu Dulbecco's z L-glutaminą, wzbogaconym wołową surowicą płodową. Komórki poddano oddziaływaniu cisplatyny i doksorubicyny w trzech dawkach w czasie 72 godzin. Oznaczenia biochemiczne wykonywano w supernatantach komórkowych, w których oznaczono aktywność następujących enzymów antyoksydacyjnych: całkowitej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz jej izoenzymów: mitochondrialnego (MnSOD) i cytoplazmatycznego (Cu/ZnSOD), katalazy (CAT), peroksydazy glutationowej (GPX), reduktazy glutationowej (GR), transferazy S-glutationowej (GST) oraz dokonano pomiarów stężenia dialdehydu malonowego (MDA). Ekspresję genu kodującego białko p53 oznaczono na poziomie transkryptu, jako stosunek liczby jego mRNA do całkowitego mRNA. Analizy dokonano z użyciem reakcji łańcuchowej polimeryzacji (RT-PCR) i elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Następnie wyniki poddano analizie statystycznej. Metodyka badań nie budzi moich zastrzeżeń.

W następnej części pracy Autorka omawia wyniki swoich badań. Wyniki te są szczegółowo przedstawione na załączonych rycinach i tabelach. Całość wyników przedstawiona została z podziałem na podrozdziały zgodnie z planowanymi badaniami. Osobno omówione zostały wyniki poszczególnych badań, z uwzględnieniem mierzonych parametrów.

W szczegółowej dyskusji Autorka podsumowuje wiedzę na temat zależności pomiędzy układem prooksydacyjno/antyoksydacyjnym a układem proapoptycznym/antyapoptycznym oraz wynikające z tego implikacje kliniczne, które to są przedmiotem zainteresowania wielu badaczy. Stara się przybliżyć i wyjaśnić znaczenie stresu oksydacyjnego w mechanizmach oddziaływania leków cytostatycznych na komórki nowotworowe i powstawaniu oporności komórek nowotworowych na to leczenie. Prawidłowo interpretuje uzyskane wyniki i

porównuje je z dostępnym piśmiennictwem. Należy też zaznaczyć, że Autorka w sposób wyważony omawia własne wyniki na tle doniesień innych autorów. Omówienie wyników i dyskusja przeprowadzone są rzeczowo, analitycznie, ze znawstwem problemu. Autorka kolejno omawia wyniki swoich obserwacji, odnosząc je do aktualnych danych z literatury. Krytycznie ocenia i wyjaśnia wątpliwości, jakie mogłyby się nasunąć po przeczytaniu jedynie wyników pracy. Rozdział ten też sugeruje drogę, jaka doprowadziła Autorkę do ostatecznych wniosków.

Wnioski, w 3 punktach, klarownie przedstawione przez Doktorantkę, są w pełni uzasadnione wynikami przeprowadzonych badań. Wszystkie wydają się być istotne: (1) Pod wpływem zastosowanych dawek i przedziału czasowego cisplatyna i doksorubicyna naruszają status oksydacyjny w komórkach ludzkiego gruczolakoraka płuc linii A549 hodowanego in vitro, (2) Pod wpływem cisplatyny dochodzi do zwiększenia nasilenia stresu oksydacyjnego, a pod wpływem doksorubicyny do zmniejszenia nasilenia stresu oksydacyjnego w komórkach ludzkiego gruczolakoraka płuc linii A549 in vitro, (3) Cisplatyna i doksorubicyna powodują spadek ekspresji białka p53 w komórkach ludzkiego gruczolakoraka płuc linii A549 in vitro. Im wyższe stężenie cytostatyku w badanej próbce, tym mniejsza ekspresja białka p53. Wnioski te zdecydowanie odpowiadają określonym na początku celom pracy, stanowią ich rozwinięcie, a nade wszystko prezentują czytelnie sprecyzowany aspekt biochemiczny, kliniczny oraz praktyczny. Sformułowane są w sposób ostrożny, dojrzały i dobitnie sugerują konieczność kontynuowania dalszych badań.

Do pracy Autorka dołącza piśmiennictwo obejmujące, jak wspomniano, 130 pozycji, w których Autorka podaje pełne tytuły cytowanych prac oraz streszczenia w języku polskim i angielskim, zawierające, między innymi, cele pracy, elementy metodyki, najważniejsze wyniki oraz wnioski.

Czytając tekst pracy doktorskiej lek. Katarzyny Jędrzejowskiej z przyjemnością stwierdzam, że nie mam żadnych krytycznych uwag, które mogłyby się nasunąć podczas analizy przedstawionej rozprawy. Praca ta stanowi przykład świetnie zaprojektowanego i przeprowadzonego badania, które stanowi wzorowe rozwiązanie problemu naukowego. Drobne błędy literowe i gramatyczne jako niemające nic wspólnego z wartością merytoryczną pracy, pozwalam sobie pominąć.

Wydział Lekarski

Katedra Fizjologii

ul. Grzegórzecka 16

PL 31-531 Kraków

tel. +48(12) 421 10 06

+48(12) 619 96 30

fax +48(12) 422 20 14

fizjologia@cm-uj.krakow.pl

Omawiana praca lek. Katarzyny Jędrzejowskiej przedstawia wyniki badań, które mają znaczenie w rozwoju nowych metod badań oraz zawiera ważne elementy poznawcze. Praca ta jest interesująca i wartościowa, a wyniki przedstawione w niej posiadają potencjał istotnego znaczenia praktycznego w diagnostyce biochemicznej oraz onkologii. Doktorantka wykazała się biegłością w wykorzystywaniu swoich umiejętności do celów naukowych, zdolnością do pracy badawczej i do krytycznego podejścia do osiągniętych wyników badań. Autorka dogłębnie zapoznała się z współczesnym piśmiennictwem dotyczącym tematu pracy i co więcej, wykazała się umiejętnością właściwego wykorzystywania go do założonych celów.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa jest rezultatem solidnego, nowoczesnego warsztatu naukowego, a nade wszystko została przygotowana rzetelnie, czytelnie, przejrzysto, napisana poprawną polszczyzną, a ryciny i tabele są dodatkowymi walorami pracy. Recenzent ma świadomość, że zastosowane badania i oznaczenia są żmudne i wymagają dobrej orientacji w temacie. Pracę oceniam wysoce pozytywnie i uważam za odpowiadającą w pełni wymogom stawianym rozprawom doktorskim oraz warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki”.

Biorąc powyższe pod uwagę z najwyższą przyjemnością przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Zdrowia Publicznego w Bytomiu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach wniosek o dopuszczenie lek. Katarzyny Jędrzejowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Stawiam także wniosek o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Piotr Ceranowicz

dr hab. n. med. Piotr Ceranowicz

Kraków, 27.06.2016 r.

Wydział Lekarski

Katedra Fizjologii

ul. Grzegórzecka 16

PL 31-531 Kraków

tel. +48(12) 421 10 06

+48(12) 619 96 30

fax +48(12) 422 20 14

fizjologia@cm-uj.krakow.pl