

Bydgoszcz, 10 września 2018 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Król,
w dziedzinie nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna, pt.:
”Receptory estrogenowe i markery stresu oksydacyjnego u kobiet z rakiem piersi”

Recenzja została przygotowana w oparciu o pismo Dyrektora Instytutu Medycyny Pracy
im. prof. J. Nofera w Łodzi, prof. dra hab. med. Konrada Rydzyńskiego
z dnia 10 lipca 2018 roku wraz z załącznikami (ASKADRY/70/2018)

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma formę profesjonalnie wydane go stustronicowego, dwustronnie drukowanego opracowania w miękkiej oprawie. Składa się z zasadniczej części o układzie typowym dla eksperymentalnych opracowań prac badawczych zawierającej wszystkie niezbędne elementy tj. stronę tytułową, spisy: treści tabel i wykresów, wykaz skrótów, wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję i wnioski. Całość uzupełnia streszczenia w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo obejmujące blisko dwieście pozycji literaturowych oraz suplement w którym zamieszczono przedruk artykułu oryginalnego autorstwa Magdaleny Król i wsp. opublikowanego niedawno w Acta Biochimica Polonica. Sposób przygotowania, układ pracy i jej forma nie budzą żadnych zastrzeżeń, są bardzo przejrzyste i wygodne dla czytelnika.

Temat przedstawionej rozprawy na pierwszy rzut oka wydawał mi się naukowo wyeksploatowany, jednak szczegółowy przegląd baz bibliograficznych zdecydowanie mnie zaskoczył, ponieważ znalazłem tylko kilka badań próbujących określić wzajemne relacje pomiędzy receptorami estrogenowymi, elementami obrony antyoksydacyjnej i biomarkerami stresu oksydacyjnego, natomiast żadne z nich nie poruszało tego tematu w kontekście raka piersi. Co do oryginalności i walorów poznawczych ocenianej rozprawy doktorskiej nie można więc mieć wątpliwości.

Na samym początku dyskusji Doktorantka przytacza intrygujące doniesienia sprzed 10 lat autorstwa zespołu Ann Nardulli z Uniwersytetu Illinois o udziale dysmutazy ponadtlenkowej,

tioredoksyny i reduktazy tioredoksyny w tworzeniu z receptorem estrogenowym kompleksu białkowego przenikającego wspólnie do jądra komórkowego. Była to w mojej ocenie wystarczająca przesłanka do podjęcia zaprezentowanych w ocenianej rozprawie doktorskiej badań z wykorzystaniem materiału klinicznego pochodzącego od pacjentek z rakiem piersi i oraz kobiet z grupy odniesienia. W szeroko zakrojonym badaniu Doktorantka postanowiła ocenić wzajemne relacje pomiędzy elementami obrony antyoksydacyjnej i biomarkerami stresu oksydacyjnego a receptorami estrogenowymi alfa i beta, w kontekście ich polimorfizmu i danych klinicznych. Dodatkowym walorem jest kompleksowe podejście do tego oryginalnego i ciekawego zagadnienia, z próbą określenia tych zależności zarówno na poziomie samych guzów nowotworowych i niezajętych wycinków piersi jak i całego organizmu w leukocytach i erytrocytach krwi obwodowej jak i osoczu.

Doktorantka wprowadza czytelnika w badany temat w czternastostronicowym wstępie teoretycznym, stanowiącym syntetyczny przegląd doniesień literaturowych. Autorka wykazała się erudycją, komunikatywnością oraz zdolnością syntetycznego przekazu treści. W podsumowaniu oceny tej części pracy pragnę stwierdzić, że została ona opracowana poprawnie pod względem merytorycznym i w satysfakcjonującym stopniu prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną mgr inż. Magdaleny Król. W kilku miejscach zabrakło może zilustrowania opisywanych treści choćby prostymi rycinami, które znacząco poprawiłyby jasność przekazu (jak choćby niełatwych do opisu budowy receptorów estrogenowych czy wzajemnych zależności pomiędzy poszczególnymi elementami obrony antyoksydacyjnej).

Część doświadczalna obejmująca 44 strony napisana jest dokładnie i z uwzględnieniem kolejnych etapów pracy eksperymentalnej, od zaplanowania badania przez rzetelny opis metod badawczych i uzyskanych wyników do dyskusji i sformułowania wniosków. Doktorantka szczegółowo opisuje grupy badanych kobiet i szczegółowo podaje ile z nich zostało włączonych do poszczególnych zadań badawczych. W opisie badanej grupy znajduje się potwierdzenie, że na wykonanie badań uzyskano zgodę właściwej Komisji Bioetycznej. Zabrakło informacji o tym, w jaki sposób zakwalifikowano kobiety do grupy odniesienia, i co – badanie lekarskie czy deklaracja uczestniczek - pozwoliła na ich określenie grupą kobiet zdrowych. W rozdziale tym Doktorantka deklaruje również, że uczestniczki badania poddane były badaniu kwestionariuszowemu które dotyczyło stylu życia, przebytych i występujących w rodzinie zachorowań, miesiączek, ciąż i zażywanych leków, w tym hormonalnych. Zastanawia mnie po co zbierano tyle danych, skoro w dalszych analizach uwzględnione zostały wyłącznie BMI, status palenia i przyjmowanie hormonalnej terapii zastępczej? Dane zaprezentowane w tabeli M1 nie zostały poddane analizie

(bądź nie zaprezentowano wyników takiej analizy) stąd nasuwają się pytanie: „Czy różnica wieku w grupach była istotna statystycznie?” Autorka podaje bowiem w opisie grup, że mediana w grupie z rakiem piersi była wyższa, lecz nie popiera tego stosowną analizą statystyczną.

Opis metod badawczych nie jest obszerny, lecz wystarczający do rzetelnej oceny sposobu prowadzenia badań. Nie znalazłem tylko informacji o tym jaki zestaw został użyty do przygotowania lizatów leukocytów z krwi obwodowej, jakie były kryteria doboru genów referencyjnych oraz czy, a jeśli tak, to w jaki sposób oceniano czystość i jakość wyizolowanego mRNA.

W liczącym 23 strony opisie wyników Doktorantka szczegółowo przedstawiła rezultaty badań, zaczynając od analiz wykonanych z użyciem fragmentów guza nowotworowego i prawidłowej tkanki gruczołu piersiowego. Stwierdziła między innymi mniejszą ekspresję *ESR1* i *GPX1* w guzie niezależnie od typu histopatologicznego, jak również dodatnią korelację *ESR1* i *GPX1* oraz ujemną między *SOD1* i *ESR1* zarówno w guzie jak i tkance prawidłowej. Analizy wykonane z użyciem leukocytów krwi obwodowej oraz osocza umożliwiły Autorce odniesienie wyników dotyczących ekspresji badanych genów, TBARS oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych do grupy kobiet zdrowych. Pacjentki z rakiem piersi charakteryzowały się mniejszą ekspresją genu *ESR1* oraz większą genów *ESR2* i *SOD1*, zaobserwowano również większą ekspresję oraz aktywność dysmutazy ponadtlenkowej u kobiet z rakiem przewodowym. W obu grupach wartości normalizowane ekspresji badanych genów były ze sobą dodatnio skorelowane. W ostatniej części Doktorantka zaprezentowała analizę częstości dwóch polimorfizmów *ESR1* oraz ich potencjalnego związku z badanymi markerami stresu oksydacyjnego, stwierdzając brak takiej zależności.

Po lekturze części eksperymentalnej nasuwa się kilka pytań i uwag dotyczących wybranego przez Doktorantkę sposobu prowadzenia analiz statystycznych, ich opisu i sposobu prezentacji wyników:

- Jaki był cel poddania danych normalizacji, a następnie ich analiza za pomocą nieparametrycznego testu Spearmana? Skoro udało się doprowadzić zmienne do rozkładu normalnego, to należałoby chyba analizować je parametrycznym testem Pearsona?
- Nie znalazłem informacji o tym, czy dane przedstawiane na wykresach korelacji są danymi przed czy po normalizacji?
- Dlaczego do porównania ekspresji genów pomiędzy guzem a tkanką prawidłową nie użyto mocniejszych testów dla prób zależnych? Autorka sama sugeruje taki podejście pisząc "W przypadku genu *SOD1* otrzymane wyniki nie wykazywały różnic (...) w guzach porównaniu

ze sparowaną tkanką prawidłową (..)”. Po takim stwierdzeniu nie wiadomo czy to sposób prowadzenia analizy czy opis tej analizy są nieprawidłowe.

- Dlaczego zależność od cechy N w Tabeli T1 na str. 32 porównywano testem Kruskala-Wallis, a nie konsekwentnie do innych zmiennych testem U Manna-Whitneya skoro tylko dwie podgrupy poddano analizie? W tabeli tej nie zostały również zaznaczone różnice istotne statystycznie, a są one opisane w poprzedzającym tekście.
- Sposób prezentacji istotności różnic w tabelach mógłby być czytelniejszy. Zgodnie z aktualnymi trendami należałoby podawać każdorazowo wartość p, a nie tylko oznaczać istotne różnice wytłuszczeniem, czy gwiazdką.
- Na jakiej podstawie w rozdziale 4.2.4 na str. 43 stwierdzono, że „na znamienność statystyczna faktyczny wpływ miała różnica wartości ekspresji pomiędzy grupą pacjentek za wskaźnikiem N2 i N3” skoro nie przedstawiono wyników analizy post-hoc?
- Szkoda, że Doktorantka nie pokusiła się o analizę korelacji ekspresji badanych parametrów między leukocytami, tkanką normalną i guzem, tym bardziej, że sama w dyskusji zadaje pytanie: „czy wyniki przeprowadzonych badań z wykorzystaniem tkanek pacjentek z rakiem piersi mają odzwierciedlenie też w innych komórkach organizmu”.

Po opisie wyników Autorka zamieściła blisko czternastostronicową dyskusję, w której umiejętnie prezentuje własne wyniki w kontekście doniesień innych badaczy. Wykazała się również rzadką umiejętnością obrony własnego zdania i uzasadniania prowadzonych badań. Dla przykładu podczas lektury opisu wyników zastanawiałem się, jakie są podstawy racjonalne badania wpływu stężenia TBARS na aktywność GPx1? Czy nie powinno się zbadać zależności odwrotnej? Przecież to aktywność antyoksydacyjna może determinować równowagę pro/antyoksydacyjną, której jednym z biomarkerów może być stężenie TBARS. Jednak już w dyskusji umiejętnie przekonała mnie do swojego toku prowadzenia analizy.

Autorka doskonale zdaje sobie sprawę z niedoskonałości i ograniczeń badanych modeli, rozważnie je dyskutuje i ostrożnie wyciąga wnioski. W wyciąganiu wniosków jest w mojej ocenie nawet zbyt powściągliwa, a te które zostały przedstawione, mają charakter typowo obserwacyjny. Uważam, że przedstawione wysokiej jakości wyniki upoważniała Doktorantkę do nieco odważniejszego, choćby spekulacyjnego wnioskowania, tym bardziej, że kilka takich stwierdzeń bez problemu odnajdujemy w dyskusji.

Z recenzenckiego obowiązku przedstawiam również listę drobniejszych uchybień zauważonych w ocenianej rozprawie:

- Autorka nadużywa lub niewłaściwie używa zdań wtrąconych oraz przecinków i apostrofów.
- W wielu tabelach: zapis wartości liczbowych p bez zera przed przecinkiem jest niepoprawny.
- W wielu tabelach i tekście: współczynnik β zamiast angielskiego „ β -coef”.
- Autorka zamiennie i niekonsekwentnie stosuje polską i angielską konwencję wyrażania stężeń roztworów, jak również przecinka i kropki jako znaku dziesiętnego.
- Str. 11. rozdz. 1.2 - rak piersi zaliczany jest do nowotworów hormonozależnych dlatego, że ich rozwój jest zależny od hormonów, a nie dlatego że czynniki ryzyka związane są aktywnością hormonów. Autorka wyjaśnia to później w rozdziale 1.4.
- Str. 11, str. 13 rozdz. 1.3 - izoformiczne odmiany białka nie są formami izomerycznymi.
- Str. 14 - nie ma enzymu „deacetylotransferaza histonowa”. Deacetylaza histonowa nie jest transferazą a amidohydrolazą. W cytowanej w tym kontekście pracy Pike i wsp. opublikowanej w EMBO Journal nie znalazłem informacji o rekrutacji białek korepresorowych oraz wspomnianego enzymu modyfikującego histony w odpowiedzi na połączenie receptora estrogenowego z agonistą.
- Str. 15 - szyk pierwszego zdania jest nieprawidłowy
- Str. 19, rozdz. 1.5 Autorka zapomniała o drobnocząsteczkowych antyoksydantach endogennych, jak kwas moczowy czy bilirubina, których pojemność antyoksydacyjna jest dużo większa niż wspomnianych związków egzogennych
- Str. 20 niepotrzebnie powtórnie wyjaśnia skrót GSSG
- Str. 24 FISH to fluorescencyjna hybrydyzacja” in situ a nie „hybrydyzacja fluorescencji”
- Str. 32 określenie „obniżenie” powinno być używane dla opisu zmian cechy w czasie/procesie a nie różnic w grupach/cechach.
- W Tabeli L1 mediana wieku lub rozstęp ćwiartkowy wieku w grupie PR „Nieznany” jest podany nieprawidłowo; niemożliwe żeby wartość mediany była niższa niż dolny kwartył.
- Str 40, rozdz. 4.2.1. - wyniki opisane w pierwszym akapicie znajdują się w Tabeli L2 a nie L3.
- Str. 47 tytuł tabeli jest niepoprawny gramatycznie i nie do końca oddaje to co w niej przedstawiono. Może lepiej: „Analiza wpływu ekspresji genów *ESR1* i *ESR2* oraz stężenia TBARS na ekspresję *GPX1* i *SOD1*”.
- Str. 54 - przytoczona w drugim akapicie praca Schultz-Norton i wsp. z 2008 roku tylko cytuje dwa oryginalne doniesienia Rao i wsp. z tego samego zespołu w Molecular

Endocrinology oraz w Journal of Molecular Endocrinology) o udziale dysmutazy ponadtlenkowej, tioredoksyny i reduktazy tioredoksyny w tworzeniu kompleksu białkowego przenikającego do jądra komórkowego. Należałoby w tym miejscu zacytować prace źródłowe.

- Str. 77 druga pozycja autorstwa Anghel i wsp. powinna być oznaczona jako „2010b”
- Braki w wykazie skrótów: DBD, LBD, ERE, GFR, IGFR, RFS, OS, SERM, SERD, SNP, ROOH, ROH, GSH, GSSG, ORE, LOH, PR.
- Literówki: str. 12 przyłączanie zamiast „przyłączania”, str. 14 ERβ „Erβ” str. 17 jednoelektronowej zamiast „jednoelektrodowej” str. 18 stężenie zamiast „stężeni”, str. 21 8-oksy-2'-deoksyguanozyny, str. 22 komórkowych „komórkowy”, str. 25 cel szczegółowy trzeci określenie zamiast „określeni”, str. 26 uczestniczących zamiast „uczestniczące”, str. 48 różnic zamiast „równic” str. 54 okoliczną zamiast „okoliczna”, str. 55 mają zamiast „maja”.

Powyższe uwagi nie wpływają na wartość merytoryczną rozprawy, którą oceniam bardzo dobrze. Chciałbym, aby stawiane w prezentowanej recenzji pytania oraz przedstawione uwagi nie zostały odebrane jako głos krytyczny, lecz by stały się elementem w dyskusji naukowej z Doktorantką.

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Król jest wartościowa badawczo, ma niewątpliwe walory poznawcze oraz dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt opublikowania znaczącej części wyników w pracy, która ukazała się niedawno w Acta Biochimica Polonica (2018;65(1):51-57, doi: 10.18388/abp.2016_1425), a w której Doktorantka jest autorem pierwszym i korespondującym. Pozostaje mieć nadzieję, że pozostałe wyniki również doczekają się publikacji, bo w pełni na to zasługują.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017r. poz 1789 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Medycyny Pracy im. prof. dra med. Jerzego Nofera w Łodzi o dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Król do dalszych etapów przewodu doktorskiego.