



16 października 2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Król pt. „Receptory estrogenowe i markery stresu oksydacyjnego u kobiet z rakiem piersi”

Podjęte w rozprawie doktorskiej prace eksperymentalne dotyczące etiopatogenezy raka sutka, potocznie nazywanego rakiem piersi (łac. *carcinoma mammae*), dotyczą najczęściej występującego nowotworu złośliwego u kobiet, co jednoznacznie rozstrzyga zasadność wyboru tematu badań. Z niejasnych przyczyn od lat 70. ubiegłego wieku odnotowywano na całym świecie wzrost zachorowań na tę chorobę i tendencja ta utrzymywała się do lat 90. W Polsce rak sutka obecnie stanowi 22% wszystkich zdiagnozowanych nowotworów u kobiet. W minionym ćwierćwieczu udaje się sukcesywnie obniżać ilość zgonów powodowana rakiem sutka, co najpewniej jest efektem licznych akcji społecznych popularyzujących zachowania sprzyjające wczesnemu wykryciu zmian patologicznych w gruczole piersiowym, w tym w szczególności upowszechniania przesiewowych badań obrazowych (mammografii i ultrasonografii piersi). Przedstawiona do oceny praca doktorska jest próbą analizy związków przyczynowo-skutkowych prowadzących do rozwoju raka sutka z poszukiwaniem wskaźników laboratoryjnych opartych o badanie krwi lub fragmentów tkanki dla prognozowania przebiegu choroby i końcowych efektów leczenia. Doktoranta w pracy badawczej skoncentrowała się na ocenie związku pomiędzy receptorami estrogenowymi alfa ($ER\alpha$) i beta ($ER\beta$) oraz wybranymi czynnikami stresu oksydacyjnego u kobiet z rakiem sutka. W analizie wyników badań laboratoryjnych poddano ocenie również zaawansowanie kliniczne choroby uwzględniające rozpoznanie histopatologiczne, a także klasyfikację TNM (T – *tumor*, N – *nodules*, M – *metastases*), a więc: wielkość guza pierwotnego, przerzuty w węzłach chłonnych i narządowe.

Rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Król ma typowy układ dla tego rodzaju opracowań, a proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami są odpowiednio zachowane. Układ redakcyjny jak i forma edytorska nie budzą istotnych zastrzeżeń. Praca liczy 92 strony i składa się z 5 rozdziałów. Tekst został wzbogacony 6 wykresami i 19 tabelami. Bardzo cennym dodatkiem jest podany na wstępie pracy szczegółowy opracowany wykaz skrótów. Wstęp rozprawy jest dobrym wprowadzeniem w tematykę badawczą, której dotyczy praca doktorska. Przedstawiono epidemiologię i etiologię oraz czynniki ryzyka raka sutka.

Dokładnie scharakteryzowano strukturę i znaczenie wariantów genetycznych receptorów estrogenowych w tej chorobie. Zdefiniowano pojęcie stresu oksydacyjnego, a także omówiono od czego zależy równowaga oksydo-redukcyjna żywych komórek: omówiono zarówno potencjalne źródła stresu oksydacyjnego jak również systemy obrony antyoksydacyjnej. Z uwagi na to, że w pracy doktorskiej badano związek receptorów estrogenowych z wybranymi enzymami antyoksydacyjnymi, opisano regulację ekspresji i aktywności cytozolowej peroksydazy glutationowej (GPX-1) i cynkowo-miedziowej dysmutazy ponadtlenkowej (Zn/Cu-SOD).

Cel główny pracy określający zależności pomiędzy receptorami ER α /Er β i stresem oksydacyjnym u kobiet z rakiem sutka sformułowano jasno i precyzyjnie na końcu wstępu, uzupełniając celami szczegółowymi, które stanowią jednocześnie plan badawczy pracy doktorskiej. Cele dotyczą najpierw oceny profilu genów receptorów ER α /Er β i wybranych enzymów antyoksydacyjnych w tkance guza i leukocytach kobiet chorych w odniesieniu do (kontroli) tkanki zdrowej i leukocytów krwi zdrowych kobiet. Następnie dokonane są szczegółowe analizy porównawcze polimorfizmu receptorów ER α na ryzyko zachorowania na raka sutka oraz ekspresję i aktywność enzymów - GPx-1 i Zn/Cu-SOD.

Na podstawie danych przedstawionych w rozdziale dotyczącym metodyki można stwierdzić, że projekt został skonstruowany właściwie. Opis metod daje możliwość powtórzenia postępowania analitycznego dla badań przeprowadzonych w rozprawie doktorskiej. Dobrze scharakteryzowano cechy kliniczne badanych grup kobiet. Starannie opisano oznaczanie profilu ekspresji genów techniką Real-Time PCR z wykorzystaniem tkanek z guza nowotworowego i tkanek otaczających morfologicznie uznanych za zdrowe, jak również leukocytów krwi obwodowej od kobiet z rakiem sutka i zdrowych. Do ustalenia polimorfizmu genu *ESR1* kodującego receptor ER α w leukocytach krwi obwodowej wykorzystano sondy TaqMan. Metodami spektrofotometrycznymi posłużono się do oznaczania w osoczu krwi aktywności GPx-1 i Zn/Cu-SOD oraz puli związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). Cenne byłoby podanie wyjaśnienia jakie znaczenie ma oznaczanie w surowicy krwi TBARS z wymienieniem puli związków, które decydują o wielkości tego parametru. Na szczególne uznanie zasługuje właściwie wykonana analiza biostatystyczna, której efekty przedstawiono dokładnie w „Wynikach” pracy doktorskiej.

Rozdział opracowania dotyczący analizy otrzymanych wyników, potwierdza sprawność Doktorantki w zakresie prezentacji i obiektywnej analizy otrzymanych rezultatów. W tej części rozprawy można znaleźć liczne ryciny i tabele, które w przejrzysty sposób podsumowują wykonaną analizę, a także pozwalają dostrzec ważne detaliczne informacje pominięte w opisie wyników. Rezultaty prac badawczych są obiektywizowane przez zastosowanie adekwatnych testów statystycznych. Doktorantka dowiodła, że występuje silna zależność wielkości ekspresji genów *ESR1* i *ESR2* oraz genów enzymów antyoksydacyjnych

GPX1 i *SOD1* bez względu na stan zdrowia. Cenną obserwacją, która może znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej jest to, że zmiany w profilu ekspresji genów *ESR1*, *ESR2* i *SOD1* daje się wykazać w leukocytach krwi obwodowej u kobiet z rakiem sutka, nie zaś u kobiet zdrowych. Wykazano jeszcze, że występujące warianty genetyczne polimorfizmów *ESR1* (rs3798577 i rs9340799) nie determinują odmiennej aktywności GPx-1 i Zn/Cu-SOD oraz stężenia we krwi TBARS u wszystkich badanych kobiet.

Dyskusja jest zwarta i klarowna, wyniki badań są precyzyjnie omawiane w odniesieniu do opublikowanych licznych badań na temat etiopatogenezy raka sutka i dziedzicznych uwarunkowań ekspresji receptorów estrogenowych i enzymatycznej obrony przed wolnymi rodnikami tlenowymi. Jest świadectwem biegłości wiedzy, którą zgłębiła Doktoranta w tematyce prowadzonych badań, a także zdolności wyprowadzania syntetycznych wniosków z mnóstwa danych uzyskanych z różnych modeli doświadczalnych.

Z obowiązku wywiązania się z niewdzięcznej roli recenzenta chciałbym wskazać na te fragmenty rozprawy doktorskiej, które nasuwają krytyczne spostrzeżenia i uwagi. W części wstępu (rozdział 1.5.) poświęconemu mechanizmom regulującym równowagę oksydoredukcyjną komórek ludzkiego organizmu zabrakło omówienia syntazy tlenu azotu, która, paradoksalnie, w formie rozprężonej (ang. *NOS uncoupling*) staje się bardzo istotnym źródłem anionu rodnika nadadtlenkowego, co w konsekwencji sprzyja tworzeniu w spontanicznej reakcji z tlenkiem azotu bardzo znaczących ilości niezwykle reaktywnego nadtlenoazotynu. Z kolei przy omawianiu enzymatycznych mechanizmów obrony antyoksydacyjnej (rozdział 1.5.1.) postawiono kontrowersyjną tezę, że cytozolowa peroksydaza glutationowa (GPx-1) jest „najbardziej efektywnym enzymem w ochronie przed skutkami stresu oksydacyjnego”. Wydaje się to zbyt śmiałe stwierdzenie biorąc pod uwagę, że w literaturze naukowej wielokrotnie dyskutowano, i to od dawna, kluczową rolę dysmutazy nadadtlenkowej w zmiataniu rodnika nadadtlenkowego (np. *World Allergy Organ J.* 2012; 5(1):9–19; 1996 *Am J Physiol.* 271(40):C1424-C1437). Wydaje się również, że w części wprowadzającej pracy doktorskiej warto byłoby wspomnieć o roli małych niekodujących cząsteczek mikro-RNA (miRNA), które indukują degradację matrycowego RNA (mRNA) lub blokują proces translacji, co skutkuje obniżoną produkcją białek. Wśród tej grupy związków wyróżnia się tzw. „*redoximiRs*”, które pełnią bardzo istotną rolę w regulacji stresu oksydacyjnego. Dzięki temu, uwzględnienie *redoximiRs* w dyskusji mogłoby wzbogacić interpretację niektórych wyników uzyskanych badań. W dyskusji pominięto próbę wyjaśnienia rozbieżności pomiędzy obniżeniem ekspresji genu *GPX1* w guzach raka sutka i jednocześnie zwiększeniem aktywności enzymatycznej GPx-1. Nie wykazano przy tym znamienych statystycznie różnic w aktywności enzymatycznej GPx-1 w krwinkach czerwonych kobiet z rakiem sutka i kobiet zdrowych. Nie rozważono też odmiennych zmian ekspresji genu *SOD1*, która wykazywała tendencję do obniżenia w tkance guza, natomiast była istotnie wyższa w

leukocytach. Towarzyszyła temu zwiększona istotnie aktywność Zn/Cu-SOD w krwinkach czerwonych kobiet z rakiem sutka w porównaniu do kobiet zdrowych.

Dla pobudzenia wyobraźni badawczej i ukierunkowania młodego naukowca ku samodzielnie prowadzonym ważnym badaniom w przyszłości warto wskazać, że pozyskanie informacji na temat efektów leczenia i losów badanych kobiet z rakiem sutka mogłoby dostarczyć cennej odpowiedzi, czy ocena ekspresji badanych w pracy doktorskiej genów byłaby pomocna w doborze hormono- i chemioterapii oraz w oszacowaniu przeżywalności. Wspomina o tym również w dyskusji dysertacji Doktorantka.

Mimo bardzo dużej staranności w przygotowaniu językowym i edytorskim dysertacji, Doktorantka nie ustrzegła się nielicznych błędów literowych, a także – co ważniejsze – błędów pojęciowych. I tak, „... w łańcuchu oddechowym ok. 2 % cząsteczek tlenu ulega niepełnej ...” jednoelektronowej, a nie „... jednoelektrodowej redukcji prowadzącej do powstania O_2^- ” (rozdział 1.5., strona 17). W tej samej części wstępu należało stwierdzić, że „dysmutacja O_2^- katalizowana jest przez dysmutazy ponadtlenkowe (SOD), a produktem tej reakcji są H_2O_2 oraz tlen ...” cząsteczkowy, a nie „... molekularny” (strona 18). Z kolei Doktorantka chciała najpewniej napisać, że „... GPx-1 rozkłada ok. 70 % H_2O_2 powstającego w aktywnych ...” neutrofilach, zamiast „neurofilach” (rozdział 1.5.1., strona 19). Zdarza się również Doktorance stosować w tekście termin „enzymy oksydacyjne” dla GPx-1 i SOD, gdy tymczasem są to enzymy antyoksydacyjne. Błąd ten pojawia się również we wniosku (nr 1) pracy doktorskiej.

Całość pracy oceniam bardzo pozytywnie. Mgr inż. Magdalena Król wykazała bardzo dobre przygotowanie teoretyczne, pełne opanowanie nowoczesnego warsztatu badawczego i umiejętność krytycznej analizy uzyskanych wyników z bardzo dobrze dobranymi narzędziami biostatystycznymi. Praca zawiera szereg elementów oryginalnych. Wyniki rozprawy wnoszą postęp w zrozumienie zależności etiopatogenetycznych raka sutka. Przytoczone uwagi krytyczne nie umniejszają istotnie wartości naukowej rozprawy doktorskiej, mają posłużyć do wzbogacenia rozwoju naukowego Doktorantki. O wartości naukowej rozprawy doktorskiej świadczą wyniki, których część dotycząca oceny zmian ekspresji genów *ESR1* i *GPX1* została już opublikowana w recenzowanym czasopiśmie naukowym *Acta Biochimica Polonica* [*Acta Biochim Pol.* 2018;65(1):51-57].

Praca spełnia warunki określone w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789 z późn. zm). W oparciu o powyższą opinię wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Pracy im. prof. dra med. Jerzego Nofera w Łodzi o dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Król do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Andrzej Kalinowski