

Dzianat MWB UG i GUMed  
Wpłynęło dnia 6.05.2016r.  
L.dz. nr 141.2016.  
*pu*



UNIWERSYTET  
MEDYCZNY  
W ŁODZI

## Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów

92-215 Łódź

ul. Mazowiecka 6/8

tel: 042 2725702

fax: 042 2725694

e-mail: malgorzata.czyz@umed.lodz.pl

www/umed.lodz.pl/zbn

Ocena pracy doktorskiej

pt. „**Wpływ metabolizmu adenozyiny na fenotyp inwazyiny**

**mysiego czerniaka B16F10**”

wykonanej przez p. mgr Monikę Gołusńk

pod kierunkiem p. Prof. dr hab. Jacka Bigdy i p. Prof. dr hab. Wojciecha Biernata

Powstawanie przerzutów jest procesem złożonym i wieloetapowym. W dalszym ciągu niewiele wiadomo na temat mechanizmów, które powodują, że pierwotny nowotwór staje się chorobą systemową. Pomimo sukcesów w leczeniu pacjentów z czerniakiem za pomocą immunoterapii blokującej immunologiczne punkty kontrolne CTLA-4 i PD-1 oraz terapii celowanej skierowanej przeciw zmutowanej kinazie BRAF i innym elementom szlaku RAS/RAF/MEK/ERK, dla większości pacjentów z czerniakiem pojawienie się przerzutów ciągle oznacza tylko kilka/kilkanaście miesięcy życia. Fenotyp inwazyiny czerniaka ma charakter przejściowy i nie ma dobrych technik, które pozwoliłyby kompleksowo zbadać ten proces.

W swojej pracy doktorskiej, wykonanej w Katedrze Biotechnologii Medycznej, p. mgr Monika Gołusńka zastosowała myszy model czerniaka. Podjęła próbę zbadania wpływu zewnątrzkomórkowej adenozyiny na wybrane aspekty rozwoju czerniaka, ze szczególnym

uwzględnieniem roli enzymu ekto-5'-nukleotydazy, inaczej CD73. Poziom nukleotydazy CD73, która hydrolizuje 5'-AMP do adenozyiny, jest podwyższony w wielu typach nowotworów, w tym w czerniaku. CD73 uczestniczy w rozwoju nowotworów na wiele sposobów, na przykład poprzez wpływ na wzrost gęstości naczyń krwionośnych wewnątrz guza. Wydaje się, że podwyższone poziomy CD73 i w konsekwencji zewnątrzkomórkowej adenozyiny w guzach niedostatecznie unaczynionych indukują proces angiogenezy, przyczyniając się do rozrostu guza. Molekularne mechanizmy tego procesu są jednak słabo poznane. Niewiele wiadomo również na temat roli adenozyiny w progresji nowotworu. W ten nurt poszukiwań wpisuje się recenzowana praca doktorska, która zawiera wyniki badań prowadzonych w zespole p. Prof. Jacka Bigdy.

## **1. Ocena części teoretycznej**

W części teoretycznej, Doktorantka krótko opisuje czynniki ryzyka zachorowania na czerniaka, diagnostykę i terapię pacjentów z czerniakiem. W kolejnych rozdziałach znajdujemy informacje na temat ekspresji, budowy i funkcji CD73, źródeł zewnątrzkomórkowej adenozyiny i jej wykorzystania jako cząsteczki sygnałowej. W oparciu o bogate piśmiennictwo przedstawia aktualny stan wiedzy na temat roli CD73 i adenozyiny w rozwoju nowotworów, skupiając się na ich udziale w promowaniu angiogenezy i przerzutowania, modulacji proliferacji i przeżywalności komórek nowotworowych oraz interakcjom z układem immunologicznym. Ta część pracy jest obszernym opracowaniem, wskazującym na dobrą znajomość tematu. Autorka nie uniknęła jednak drobnych błędów. Na przykład, CD73 katalizuje defosforylację monofosforanów nukleozydów purynowych, nie monofosforanów purynowych, do odpowiadających im nukleozydów purynowych, nie puryn (str. 8). Ponadto, komórki powstają i dojrzewają, nie są produkowane (str. 15), a w organizmie występują narządy, nie organy (str. 17). Niektóre zdania wydają się być próbą dosłownego tłumaczenia z języka angielskiego, np.: „Wpływu aktywacji obniżających stężenie cAMP receptorów A2A i A2B na proliferację nie badano”. Niemniej jednak jest to istotny podrozdział omawiający zagadnienia, które są przedmiotem badań prezentowanych w rozprawie doktorskiej.

Podsumowując, część teoretyczna dysertacji stanowi dobre wprowadzenie do części doświadczalnej rozprawy. Z tej części pracy wynika, że wybór kierunku badań był uzasadniony.

## **2. Ocena metodyki badań oraz wartości merytorycznej**

Część doświadczalna pracy jest wielowątkowa. Wprawdzie Autorka nie podaje, czy wyniki badań, które składają się na dysertację, zostały opublikowane, znaczącą ich część można odnaleźć w trzech pracach zbiorowych, które ukazały się w *Oncology Reports* (2014), *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (2015) i *PLoS ONE* (2016). Udział Doktorantki i pozostałych współautorów powinien być określony w stosownych oświadczeniach dołączonych do dysertacji. Wydaje się, że Doktorantka starała się połączyć w całość te fragmenty publikacji, które powstały z Jej udziałem. Są to jednak publikacje, które chociaż powiązane tematycznie dotyczą różnych zagadnień. Z jednej strony Doktorantka uczestniczyła w intensywnych poszukiwaniach dowodów na istotną rolę enzymu CD73 w indukcji angiogenezy i rozrostu guzów czerniakowych. Z drugiej strony zajęła się udziałem różnych receptorów P1 dla adenozyiny w procesach związanych ze wzrostem guzów i angiogenezą. Badała również wpływ aktywności enzymu CD73 na interakcje z komórkami układu immunologicznego. Powiązanie niektórych wątków nie jest dobrze uzasadnione w dysertacji. Być może dlatego, że niektóre istotne wyniki opublikowane w w/w pracach zostały otrzymane przez innych członków zespołu i z tego powodu nie zostały włączone do dysertacji. Trudno jest samodzielnie prowadzić badania, szczególnie w bardzo dobrych, intensywnie pracujących i dobrze publikujących laboratoriach. Pomimo drobnych niedociągnięć, w opinii recenzenta, Doktorantka poradziła sobie w tej sytuacji nie najgorzej.

Od strony metodycznej praca jest bardzo rozbudowana. Część badań przeprowadzono na modelu czerniaka *in vivo*. Doktorantka otrzymała również linię komórkową czerniaka z obniżoną ekspresją CD73. W swoich badaniach p. mgr Monika Gołuńska zastosowała szereg metod biologii komórkowej i molekularnej, w tym cytometrię przepływową, mikroskopię fluorescencyjną, immunohistochemię, test ELISA, transfekcję, Matrigel Plug Assay, mikromacierze białkowe i

Western blot. Opisy większości metod są wystarczająco szczegółowe. Drobne uwagi są następujące: (1) przy opisie metody Western blot należy podawać ilość naniesionego białka, nie objętość próbki; (2) w opisie wywoływania kliszy podano, że dwukrotnie zastosowano wywoływacz, zamiast wywoływacz i utrwalacz; (3) nie jest jasne na czym polegała procedura optymalizacji badań cytometrycznych, gdyż z opisu wynika, że zamiast badać wyłącznie antygen powierzchniowy, Doktorantka zastosowała inne przeciwciała i permabilizację błony komórkowej w celu określenia odsetka komórek z wysoką ekspresją CD73, również w cytoplazmie; (4) na Rycinie 6, ilustrującej tę optymalizację, jest wiele błędów i niedociągnięć, w tym: brak opisów osi i podziałki, panel A został prawdopodobnie zamieniony z panelem B, na jednym z paneli powinny być przedstawione przeciwciała sprzężone z Cy3 (na Rycinie w obu panelach mamy PE), oraz zamiast kontroli izotopowej powinna być kontrola izotypowa.

W dysertacji Doktorantka wykazała, że CD73 promuje wzrost guzów czerniakowych *in vivo*. Przedstawione w rozdziale 6.5 stwierdzenie, że stymulacja receptorów adenozyliny hamuje wzrost guzów nie jest jednak uzasadnione. Stymulacja receptorów specyficznymi agonistami odbywała się w obecności inhibitora CD73 i nie odnotowano znamiennej statystycznie różnicy między wzrostem guzów w obecności tylko inhibitora CD73 i wzrostem w obecności inhibitora i agonistów. Zastosowanie inhibitora aktywności CD73 powodowało również zmniejszenie całkowitej liczby naczyń krwionośnych w guzach. Doktorantka wykazała również, że guzy powstałe po podaniu komórek czerniaka z genetycznie obniżoną ekspresją CD73 oraz te hodowane w obecności chemicznego inhibitora CD73 charakteryzuje niższa infiltracja przez makrofagi. Zastosowanie agonistów indukowało rekrutację makrofagów, przy czym zjawisko to było statystycznie znamienne tylko dla agonistów receptorów  $A_{2A}$  i  $A_3$  (Ryc. 24). Doktorantka próbowała również znaleźć zależność między poziomem adenozyliny i wydzielaniem cytokin prozapalnych, proangiogennych i proapoptotycznych. Zastrzeżenia budzi jednak sposób interpretacji wyników uzyskanych metodą *Antibody Array*. Zdjęcia macierzy, które zostały zamieszczone w dysertacji, nie uzasadniają wyboru IL-2 i bFGF chyba, że rozmieszczenie przeciwciał w macierzy było inne niż przedstawione w Tabeli 1.

Wyniki otrzymane w ramach pracy doktorskiej są interesujące biorąc pod uwagę rozważaną terapię anti-CD73. W dyskusji, która została podzielona na kilka podrozdziałów, doktorantka odnosi swoje wyniki do istniejącego stanu wiedzy. Dyskusja jest kompetentna, aczkolwiek dyskutowane są również wyniki, które nie zostały pokazane w dysertacji, np. zaburzenia cyklu komórkowego czy indukcja apoptozy.

### 3. Ocena strony redakcyjnej pracy doktorskiej

Recenzowana praca ma typowy układ dysertacji doktorskiej w zakresie nauk przyrodniczych. Przedstawione opracowanie liczy 106 ponumerowanych stron i zawiera 28 rycin i 1 tabelę. Do pracy dołączono bogatą literaturę, przy czym ponad 10% to artykuły opublikowane w ciągu ostatnich dwóch lat. Świadczy to o aktualności problemu podjętego w pracy doktorskiej. Autorka cytuje najważniejsze pozycje piśmiennictwa światowego. Wiele pozycji to publikacje polskich zespołów, w tym z zespołu, w którym powstała praca doktorska. Hierarchiczny podział dużych rozdziałów rozprawy pozwala czytelnikowi na sprawne poruszanie się w całości rozprawy. Większość Rycin wykonano starannie, jednak ich opisy nie ułatwiają czytelnikowi zapoznanie się z wynikami badań. W dysertacji brak jest wykazu skrótów, a skróty po raz pierwszy pojawiające się w tekście pracy, nie zawsze są rozwijane.

W pracy znaleziono niewielką liczbę pomyłek edytorskich oraz kilka nieprawidłowo użytych lub niezręcznych określeń. Są to m.in.:

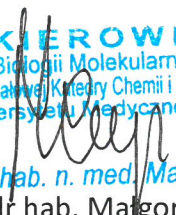
- stosowanie dużych liter nie zawsze jest uzasadnione i jednolite w całym tekście;
- 'molekuła', powinno być 'cząsteczka' lub w tym konkretnym przypadku 'białko' (str. 8); 'zwnątrzkmrkwej' powinno być 'zwnątrzkomórkowej', ten błąd występuje w kilku miejscach; 'Wtym' powinno być 'W tym' itp.;
- zdarzają się powtórzenia typu 'Rycina9Rycina9' (str. 82), 'biologicznie aktywnego biologicznie' (str. 85).

Poza tymi drobnymi niedociągnięciami stwierdzam, że praca w warstwie edytorskiej została przygotowana poprawnie, zgodnie z normami przyjętymi dla prac doświadczalnych.

### 3. Wnioski końcowe recenzji

W podsumowaniu uważam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska p. mgr Moniki Gołuńskiej, przygotowana pod kierunkiem p. Profesora Jacka Bigdy i p. Profesora Wojciecha Biernata dotyczy interesujących i aktualnych zagadnień naukowych. Część doświadczalna pracy została zrealizowana z wykorzystaniem właściwie dobranych i nowoczesnych metod badawczych. Uzyskane wyniki zostały zinterpretowane w oparciu o obserwacje własne, doświadczenia zespołu oraz doniesienia literaturowe. Uwagi krytyczne, które powstały podczas czytania pracy nie wpływają na pozytywną ocenę pracy. Wątpliwości dotyczące sposobu przedstawienia niektórych wyników powinny zostać rozstrzygnięte w czasie obrony pracy doktorskiej.

Uważam, że rozprawa spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim. Mam zatem zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej p. mgr Moniki Gołuńskiej i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów procedury nadania stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.

**KIEROWNIK**  
Zakładu Biologii Molekularnej Nowotworów  
Międzywydziałowej Katedry Chemii i Biochemii Medycznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
  
Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Czyż  
/Prof. dr hab. Małgorzata Czyż/

Łódź, 30 kwietnia 2016 r