



Dziekanat MWB UG i GUMed

Wpłynęło dnia 14.04.2016L.dz. nr 11/2016

KATEDRA I ZAKŁAD HISTOLOGII

80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1

tel. 0 58 349 14 37

fax 0 58 349 14 19

e-mail: histolog@gumed.edu.pl

dr hab. Michał Zmijewski, Prof. nadzw. GUMed  
Katedra Histologii,  
Gdańsk Uniwersytet Medyczny,  
ul. Dębinki 1a, Pokój 230  
80-211 Gdańsk, Pomorskie  
Polska

2016 04. 14

Tel: +48 583491455

Fax: +48 583491419

Email: mzmijewski@gumed.edu.pl

Gdańsk, 04.04.2016

### Recenzja rozprawy doktorskiej magister Moniki Gołuńskiej

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej mgr **Moniki Gołuńskiej** jest:

„**Wpływ metabolizmu adenozyiny na fenotyp inwazyjny mysiego czerniaka B16F10**”.

Promotorem rozprawy jest **Prof. dr hab. Jacek Bigda** (Katedra Biotechnologii Medycznej, MWB UG i GUMed, Gdańsk), a funkcję kopromotor pełni **Prof. dr hab. Wojciech Biernat** (Katedra i Zakład Patomorfologii, Wydział Lekarski, GUMed, Gdańsk).

#### 1) Trafność podjętej tematyki i jej oryginalność.

Czerniak to złośliwy nowotwór skóry wywodzący się z komórek pigmentowanych - melanocytów. Częstość jego występowanie nie jest wysoka w porównaniu do innych nowotworów, natomiast wysoki potencjał do tworzenia przerzutów oraz brak skutecznej terapii powoduje, że czerniak jest bardzo poważnym problemem medycznym. Światło ultrafioletowe, emitowane między innym przez słońce jest jednym z głównych czynników wywołujących czerniak, dlatego też od wielu lat prowadzona jest kampania wskazująca na szkodliwe skutki opalania. Niestety, promieniowanie ultrafioletowe jest również niezbędnym czynnikiem warunkującym skórą produkcję witaminy D. Ograniczenie ekspozycji na światło słoneczne, przyczyniło się do obserwowanego obecnie na całym świecie znacznego niedoboru witaminy D, który nie tylko prowadzi do zaburzenia metabolizmu kostnego (osteoporozy, osteomalacji), ale również jest ważnym czynnikiem wpływającym na rozwój wielu chorób cywilizacyjnych, w tym nowotworów. Dlatego też, istotne jest znalezienie skutecznej terapii czerniaka; oraz promocja umiarkowanego opalania, z wyłączeniem grup ryzyka (bardzo jasna karnacja skóry i włosów, osoby z włosami rudymi i piegami, uwarunkowania genetyczne).

Tak więc, biorąc pod uwagę, że czerniak stanowi bardzo istotny problem kliniczny, oraz fakt, że globalny niedobór witaminy D jest spowodowany unikaniem słońca, wydaje się, że poznanie mechanizmów molekularnych prowadzących do rozwoju czerniaka, ze szczególnym uwzględnieniem tworzenia przerzutów jest bardzo istotny zagadnieniem badawczym.

## 2) Struktura pracy

Rozprawa doktorska Pani mgr **Moniki Gołuńskiej** została przygotowana w formie monografii. Na uwagę zasługuje fakt, że chociaż praca przedstawiona jest w tak zwanym „starym trybie” to duża część przedstawionych w niej danych została opublikowana w trzech publikacjach naukowych (PLoS One. 2016;11(3):e0151420, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology (2015) 69:1–10 oraz Oncology Reports (2014) 31: 819-827, 2014), w których to pracach doktoranta jest odpowiednio 2, 2 i 3 autorem.

Praca ma klasyczny układ i obejmuje 107 stron tekstu, 28 rycin oraz załączniki zawierające zgody komisji etycznej na przeprowadzenie badań. Po spisie treści znajduje się bardzo dobrze przygotowane streszczenie, a następnie umieszczony bardzo rzetelnie napisany wstęp. Tekst wstępu podzielny na szereg podrozdziałów, w którym autorka podsumuje stan najnowszej wiedzy dotyczącej czerniaka. Kolejnym zagadnieniem omawianym w tym rozdziale potencjalny wpływ ekto-5'-nukleotydaza (CD73), produkowanej przez niego zewnątrzkomórkowej adenozyiny oraz receptorów dla adenozyiny na rozwój czerniaka, unaczynienie guzów, oraz występowanie przerzutów. Być może z myślą o publikacji przeglądowej warto byłoby rozszerzyć wstęp o omówienie angiogenezy z uwzględnieniem różnic między tworzeniem naczyń w warunkach fizjologicznych i w tkance nowotworowej, oraz zadbanie o lepszą jakość prezentowanych rycin.

Cel pracy została dobrze zdefiniowany i obejmuje badania wpływu zewnątrzkomórkowej adenozyiny na rozwój czerniaka ze szczególnym uwzględnieniem roli ekto-5'-nukleotydazy (CD73). Warto przy okazji zwrócić uwagę, że sam poziom adenozyiny, ani jej metabolizm nie był badany, a główna część rozprawy dotyczy efektów wyciszenia CD73 – głównego enzymu katalizującego syntezę zewnątrzkomórkowej adenozyiny oraz modulacji aktywności receptorów dla adenozyiny.

Następnie praca zawiera obszernie omówienie materiałów i metod. Autorka w sposób logiczny i sumienny przedstawia listę odczynników, urządzeń oraz w bardzo dokładnie opisuje wykorzystaną metodykę. Pewne zastrzeżenie budzi umieszczenie skalpela na liście urządzeń, ale jak myślę było to narzędzie szczególnie istotne w badaniach.

Rozdział Wyniki jest bardzo obszerny, bowiem liczy 31 strony, na których doktorantka w sposób bardzo systematyczny i przystępny wyjaśnia czytelnikowi założenia doświadczalne oraz prezentuje wyniki, które dodatkowo zilustrowane zostały 24 rycinami.

Następny rozdział to Dyskusja, w której autorka w sposób bardzo wyważony omawia kolejno uzyskane wyniki w świetle dostępnej literatury oraz w oparciu o inne wyniki uzyskane przez zespół Profesora Jacka Bigdy. Szkoda tylko, że dyskusja nie została wzbogacona o podsumowującą rycinę. Praca zwięźcza obszerny spis cytowanej literatury, w którym przeważają kluczowe prace z ostatnich lat.

## 3) Ocena uzyskanych rezultatów

Na wstępie chciałbym podkreślić, że ilość przeprowadzonych eksperymentów przez mgr **Monikę Gołuńską** jest imponująca i obejmuje szereg bardzo skomplikowanych badań z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych. Powierzenie tego

typu badań doktorantce świadczy o świetnym opanowaniu przez nią metodyki oraz umiejętność pracy zespołowej.

Rozdział wyniki rozpoczyna się opisem przeprowadzonych przez doktorantkę badań *in vitro* mających na celu ocenę ekspresji CD73 w komórkach mysiej linii czerniaka B16F10 oraz uzyskanie stabilnej linii komórkowej czerniaka B16F10 o obniżonym lub braku ekspresji CD73 przy użyciu techniki interferencji RNA. Następnie przy wykorzystaniu linii czerniaka B16F10, jej subkolonu o obniżonym poziomie CD73 (B16F10 CD73 KD), oraz analogu adenozyiny AOPCP, który hamuje aktywność enzymatyczną CD73, doktorantka zbadała wpływ CD73 na wzrost guzów nowotworowych oraz ich unaczynienie. Badania przeprowadzono na dwóch szczepach myszy: typu dzikiego WT (C57BL/6J) oraz szczepie C57BL/6J CD73 KO z delecją CD73. W badaniach zastosowano również zestaw specyficznych antagonistów receptorów dla adenozyiny, co umożliwiło zbadanie potencjalnych ścieżek sygnalizacyjnych aktywowanych przez zewnątrzkomórkową adenozyinę. Przy wykorzystaniu wyżej opisanego warsztatu badawczego doktorantka przetestowała wpływ zahamowania ekspresji CD73 na wzrost, angiogenezę w obrębie guzów nowotworowych, ich infiltrację przez komórki układu odpornościowego (limfocyty CD8 oraz makrofagów) oraz zdolność komórek czerniak do tworzenia przerzutów.

Wśród najistotniejszych wniosków wynikających z przeprowadzonych badań należy wymienić:

- Wykazanie, że ekspresja białko CD73 stymuluje wzrost guzów czerniaka, stymulację angiogenezę oraz tworzenie przerzutów przez komórki czerniaka
- Wykazanie, że aktywacja receptorów dla adenozyiny moduluje angiogenezę nowotworową
- Wykazanie, że ekspresją białka CD73 oraz aktywacja receptorów dla adenozyiny moduluje wydzielanie cytokin prozapalnych, proangiogennych oraz proapoptotycznych, jak również naciekanie guzów nowotworowych przez makrofagi.

Przedstawiona do oceny praca doktorska wnosi znaczący wkład w poznanie procesów towarzyszących angiogenezie nowotworowej, która to jest kluczowym elementem umożliwiającym zarówno wzrost guzów, jak i tworzenie przerzutów. Zaprezentowane wyniki wskazują na znaczącą rolę zewnątrzkomórkowej ekto-5'-nukleozydazy (CD73) w stymulacji angiogenezy nowotworowej oraz rolę receptorów dla adenozyiny w tym procesie. Wydaje się, że przedstawiony model może stać się podstawą do opracowania nowej terapii przeciwnowotworowej w oparciu o zahamowanie aktywności CD73. Warto również podkreślić, że większość przedstawionych wyników oraz wniosków z badań była już zrecenzowana przez niezależne grono ekspertów przed ich publikacją.

#### **4) ocena zastosowanej metodologii**

W przypadku oceny metodologii należy podkreślić bardzo bogaty warsztat badawczy wykorzystany przez doktorantkę. Bardzo dobrze zaplanowana została również część doświadczenia. Wybór szczepów mysich C57BL/6J (szczep dziki) oraz szczepie

C57BL/6J CD73 KO pozbawionego białka CD73 w połączeniu z synergistyczną w stosunku do niego linią czerniaka mysiego B16F10 oraz komórkami B16F10 CD73 KD, umożliwiło zbadanie wpływ białka CD73 na rozwój czerniaka, jego unaczynienie oraz zdolność do tworzenia przerzutów do płuc. Dzięki temu doktorantka wykazała, efekt synergistyczny ekspresji CD73 w komórkach gospodarza oraz komórkach czerniaka na unaczynienie oraz wzrost guzów. Natomiast dobrze dobrany zestaw specyficznych agonistów dla receptorów adenozyiny umożliwił zaobserwowanie pewnych różnic we wpływie aktywacji poszczególnych izoform receptora na powstawanie naczyń krwionośnych. Doktorantka wykazała, że optymalny wzrost guzów wymaga aktywacji co najmniej dwóch receptorów, co wskazuje na złożony mechanizm aktywacji angiogenezy przez adenozyinę.

Omawiając metodykę wykorzystaną w pracy należy podkreślić, że mgr Monika Gołuńska oprócz pracy ze zwierzętami świetnie posługuje się technikami biologii molekularnej służącymi do detekcji białek przy wykorzystaniu techniki western blot, ELISA czy też szeregiem technik immunohisto- i cytochemicznych.

Przy tej okazji należy wspomnieć, że bardzo ambitny plan badań oraz ilość zaplanowanych doświadczeń, wpłyną na ograniczenie ilości powtórzeń niektórych doświadczeń, na co również zwraca uwagę sama doktorantka. Wydaje się to mieć wpływ na spore odchylenie standardowe w przypadku niektórych punktów pomiarowych (np. rycina 23 czy 26). Należy jednak podkreślić, że ta uwaga nie odnosi się do głównych tez rozprawy, a problemy techniczne związane z niewielką ilością dostępnego materiału biologicznego są zrozumiałe i dobrze opisane przez doktorantkę.

Podsumowując, uważam, że wykorzystany model badawczy jak i metodyka wskazują, na wysoką umiejętność doktorantki, dużą pracowitość oraz dogłębne zrozumienie tematyki badawczej.

Mam kilka drobnych pytań dotyczących części doświadczalnej:

- Zastanawiające jest, dlaczego po bardzo czasochłonnej selekcji klonów o obniżonej ekspresji CD73 zdecydowano się na zmieszanie dwóch wyselekcjonowanych klonów.
- Dlaczego, nie mierzono poziomu samej adenozyiny, w celu potwierdzenia skuteczności wyciszenia CD73 oraz wykluczenia wpływu adenozyiny pochodzącej z innych źródeł?
- Rozdział 6.7. dotyczy oznaczenia względnej ilości cytokin przy wykorzystaniu macierzy z przeciwciałami. Autorka wskazuje, że po analizie otrzymanych wyników podjęła decyzję o dalszym badaniu dwóch spośród przebadanych cytokin: bFGF oraz IL2. Jak wykonano tę analizę, czy była to analiza densytometryczna? Na podstawie przedstawionych zdjęć membran trudno jest ocenić zmiany względnej ilości tych dwóch białek (Rycina 19). Co ciekawe wyraźny efekt zahamowania CD73, widać w przypadku metaloproteinazy 2 (MMP2), ale jak rozumiem badanie metaloproteinaz nie było głównym celem tego doświadczenia.
- Bardzo interesujący jest również wpływ DMSO na unaczynienie guzów oraz inne wyniki doświadczalne. Wydaje mi się, że wymaga to dokładniejszego omówienia.

## 5) ocena poprawność formalno-językowa oraz układu pracy.

Praca napisana jest poprawnie pod względem językowym i nie ma problemu, ani ze zrozumieniem treści, ani z podążaniem za tokiem rozumowania autorki. Z racji pełnionej funkcji recenzenta muszę zwrócić uwagę na pewne drobne błędy zarówno językowe jak i merytoryczne, które pojawiły się w pracy. Pozwolę sobie, więc wypunktować parę drobnych przykładów:

- We Wstępie (strona 12), pojawia się stwierdzenie, że w warunkach fizjologicznych angiogeneza następuje jedynie w procesie gojenia ran, jajniku w trakcie cyklu miesięcznego oraz w łożysku podczas ciąży. W tym wypadku, wydaje mi się bardziej istotne, żeby wspomnieć o macicy.
- Na liście urządzeń (strona 31), jako kraj produkcji wymienione są zarówno: Niemcy jak i Germany, Polska i Poland, została również wymieniona Japonika.
- W rozdziale Metody, pojawią się bardzo częsty w tego typu opracowaniach, skrót myślowy (strona 34) „Komórki mroziłam poprzez zawieszanie 1-5 mln komórek ... w schłodzonej do 4°C pożywce mrożącej”. Oczywiście cała opisana procedura zapewne prowadzi do zamrożenia komórek, ale chyba nie da ich się zamrozić w 4°C.
- Procedura regeneracji błon w celu ponownego ich wykorzystania do detekcji innych białek przy wykorzystaniu techniki western blot określone jest terminem potocznym „stripowanie” (strona 36).
- Przy opisie cytometrii przepływowej pojawia się „bufor barwiący” jednak nie zawiera on żadnych substancji barwiących, więc wydaje się, że właściwsze byłoby użycie sformowania np. bufor do cytometrii.

## 5) wnioski końcowe.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska opiera się na serii bardzo dobrze zaplanowanych i przeprowadzonych doświadczeń z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych. Uzyskane wyniki stanowią znaczny wkład w poszerzanie naszej wiedzy o mechanizmach angiogenezy nowotworowej oraz mogą prowadzić do opracowania nowych celów terapeutycznych w leczeniu czerniaka i innych nowotworów.

**Uważam, więc, że przedstawiana do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego też pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Biotechnologii UG i GUMed w Gdańsku wniosek o dopuszczenie mgr Moniki Gołuńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Stosownie do Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego stwierdzam, że rozprawa doktorska odpowiada warunkom Ustawy z dn. 18 marca 2011 r. o stopniach i tytułach naukowych, a dorobek naukowy kandydata uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Dodatkowo z uwagi na fakt, że większość wyników zaprezentowanych w monografii mgr Moniki Gołuńskiej zostało już opublikowanych w dobrych czasopismach naukowych o łącznym czynniku oddziaływania 9.581, wnioskuje do Wysokiej Rady MWB UG i GUMed o wyróżnienie pracy.**

dr hab. Michał Żmijewski, Prof. GUMed

