



Gdańsk, 2 lipca 2019

Katedra Biotechnologii Medycznej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed
ul. Dębinki 1
80-210 Gdańsk
tel. 58 349 15 85
rsadej@gumed.edu.pl

Ocena pracy doktorskiej mgr anal. med. Hanny Hołysz zatytułowanej: „Próba identyfikacji markerów raka piersi w oparciu o analizę polimorfizmów w genach *ABCB1*, *LER* i *LEPR* oraz ocena roli glikoproteiny-P w odpowiedzi komórek linii raka piersi na działanie doksorubicyny”.

Rak piersi (BCa) to najczęstszy nowotwór złośliwy u kobiet, prowadzący globalnie do ponad 620 tysięcy zgonów rocznie (dane WHO, 2018). Pomimo postępu w terapii tej choroby ogromny problem stanowi wzrastająca zachorowalność na raka piersi. W związku z tym poszukiwanie nowych markerów diagnostycznych i prognostycznych nadal pozostaje aktualnym wyzwaniem współczesnej biologii medycznej.

Praca doktorska mgr Hanny Hołysz dotyczy oceny potencjalnego znaczenia diagnostycznego i predykcyjnego wybranych polimorfizmów genów *ABCB1*, *LER* i *LEPR*. Grupę badawczą stanowiło 209 pacjentek chorych na BCa oraz 202 zdrowe kobiety. Występowanie danego polimorfizmu korelowano z masą ciała pacjentek oraz wybranymi parametrami kliniko-patologicznymi chorych. W drugiej części pracy, doświadczeniach *in vitro*, szacowano zależność między polimorfizmem genu *ABCB1* a poziomem ekspresji i aktywnością odpowiadającego mu białka oraz odpowiedzią komórek raka piersi na doksorubicynę. Doktorat dotyczy aktualnego i istotnego zagadnienia, a prezentowane wyniki są oryginalne. Praca doktorska została zrealizowana pod opieką merytoryczną dr. hab. Błażeja Rubisia, który posiada znaczący dorobek w szeroko pojętej biologii komórki nowotworowej.

Praca doktorska mgr Hołysz to napisany po polsku maszynopis liczący 134 stron, o strukturze standardowej dla prac doktorskich (i innych opracowań z obszaru nauk doświadczalnych) tj. wstęp, cele pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja, streszczenie i spis literatury. Dodatkowo na końcu rozprawy Autorka umieściła cenne dla potencjalnego czytelnika podsumowanie pracy. Manuskrypt napisany jest bardzo dobrze, język jest fachowy i logiczny,

a ilość zauważonych przeze mnie błędów językowych jest znikoma, z wyjątkiem stosunkowo dużej liczby literówek.

Oceniając stronę redakcyjną pracy mam następujące uwagi:

- w wykazie skrótów IDC (ang. *Invasive Ductal Carcinoma*) przetłumaczone jest jako „naciekający rak sutka”, tymczasem fachowo jest to inwazyjny przewodowy rak piersi. Nazwy MDA-MB-231 i MCF7 - przetłumaczone są jako „linia komórkowa raka piersi”. Są to nazwy własne konkretnych linii komórkowych i zwyczajowo się ich nie rozwija/tłumaczy,
- w pracy skrót PgR, tłumaczony jako receptor progesteronu, błędnie używany jest zarówno w przypadku genu jaki i jego produktu białkowego, którego odpowiednio dotyczy akronim PR,

Wstęp rozprawy podzielony jest na dwie zasadnicze części. Pierwsza poświęcona jest przedstawieniu epidemiologii raka piersi ze szczególnym uwzględnieniem czynników inicjujących rozwój tej choroby. Druga część opisuje budowę i funkcję ABCB1, leptyny i jej receptora, oraz znaczenie polimorfizmów w genach kodujących te białka w patogenezie raka piersi i odpowiedzi jego komórek na stosowane terapie. Ten rozdział napisany jest dobrze i dostarcza koniecznej wiedzy, potrzebnej do zrozumienia dalszych części rozprawy. Po wstępie jasno i dość szczegółowo sprecyzowane są cele pracy. Rozdział „Odczynniki, materiały, metody” jest wyczerpujący i zawiera wszystkie informacje niezbędne do ewentualnego powtórzenia doświadczeń. Znajduje się tu jednak stosunkowo rozległy opis mechanizmu działania i zastosowania doksorubicyny. Wydaje mi się, że fragment ten powinien raczej poprzedzić właściwe wyniki doświadczeń z doksorubicyną. Rozdział wyniki przygotowany jest dobrze, wszystkie tabele i ryciny są czytelne i zrozumiałe. Zarówno analizy kliniczne jak i doświadczenia *in vitro* wykonane są zgodnie z obowiązującymi trendami a ich wyniki rzetelnie udokumentowane. „Dyskusja” rozprawy jest dogłębna, wnikliwa i krytyczna, co bez wątpienia świadczy o dojrzałości autorki.

Mam następujące uwagi i komentarze odnośnie recenzowanej rozprawy doktorskiej:

- we wstępie w opisie markerów prognostycznych opisując HER2, warto byłoby wspomnieć, że w przypadku HER2-pozytywnego BCa receptor ten jest rutynowym celem terapii opartej o przeciwciała trastuzumab (standardowo w połączeniu z chemioterapią). Wprawdzie pojawia się stwierdzenie, że `zablokowanie tego receptora przez swoiste przeciwciała monoklonalne IgG1 skutkuje lepszą odpowiedzią na stosowaną terapię` lecz zdanie to jest w moim odczuciu nieprecyzyjne.

- w Tabeli 2 - wykazie substratów białka ABCB1 stosowanych w leczeniu nowotworów pojawia się tamoksifen, a jako jego zastosowanie wskazany jest zaawansowany rak piersi. Tamoksifen tymczasem jest najpowszechniejszym lekiem w ER-pozytywnym pierwotnym BCa.
- przy opisie ER i PR pada stwierdzenie, że nadekspresja tych receptorów w komórkach raka piersi jest niekorzystnym prognostycznie markerem i koreluje z krótszym czasem przeżycia. Zdanie to jest nieco mylące. Faktem jest, że stymulacja szczególnie ER przez estrogeny promuje proliferację ER-pozytywnych (luminalnych) BCa. Porównując jednak z innymi podtypami raka piersi fenotyp luminalny (a szczególnie luminalny A tj. ER- i PR-dodatni) jest najlepiej rokujący.
- na stronie 25 pojawia się zdanie 'Leptyna może także regulować działanie receptora estrogenowego alfa, znajdującego się na powierzchni komórek'. ER α , podobnie jak inne receptory hormonów sterydowych, standardowo znajduje się w cytoplazmie i jądrze komórkowym. Faktem jest, że pula ER α może ulegać palmitylacji, czego skutkiem jest lokalizacja w obrębie wewnętrznej warstwy błony komórkowej. ER α nigdy natomiast nie znajduje się na powierzchni komórki.
- na stronie 73 znajduje się stwierdzenie, że ocena ekspresji ER, PR i HER2 w tkankach pacjentów umożliwiła określenie stopnia zaawansowania choroby. Informacja ta jest nieprecyzyjna. Ekspresja tych antygenów pozwala na zakwalifikowanie do danego podtypu BCa.
- prosiłbym o wyjaśnienie dlaczego do badań odpowiedzi komórek raka piersi na doksorubicynę wybrano linię MCF7, która reprezentuje luminalny A (tj. ER+/PR+, na stronie 63 znajduje się natomiast błędna informacja, że komórki MCF7 nie ekspresjują PR) rak piersi. Pacjentki o takim podtypie BCa standardowo leczone są hormonalnie a chemioterapia, przynajmniej w stadium wczesnym bądź zaawansowanym miejscowo, nie jest stosowana. Czy nie lepiej byłoby równoległe do linii MDA-MB-231 zastosować drugą linię potrójnie-ujemnego raka piersi.
- w sekcji „Wyniki” na wykresie 4 i 5 brakuje legendy do osi y. Domyślam się, że oba wykresy przedstawiają liczbę komórek w danym punkcie czasowym. Do wykresów brakuje również stosownych adnotacji w tekście.
- doświadczenia z rodaminą B sugerują, że zwiększona aktywność ABCB1 jest odpowiedzialna za słabą odpowiedź komórek MDA-MB-231 na doksorubicynę. W jaki sposób moglibyśmy potwierdzić to założenie?

Pomimo wyżej wymienionych uwag i komentarzy, nie mam najmniejszych wątpliwości, że jest to bardzo wartościowy doktorat posiadający szereg godnych uwagi zalet. Wymienić należy tu widoczną pracowitość Autorki (liczba przeanalizowanych przypadków – chorych i kontrolnych), logicznie zaplanowany cykl eksperymentalny oraz jasność i uczciwość prezentowanych wyników (zamieszczone są również wyniki negatywne). Chciałbym również podkreślić, że weryfikacja i poszerzenie części otrzymanych z analiz klinicznych wyników w modelu hodowli komórkowych jest cenne. Takie komplementarne podejście do badanego zagadnienia, obejmujące zarówno analizy z materiałem klinicznym jak i nowoczesne modele *in vitro*, jest dominującym trendem we współczesnej onkologii molekularnej i cechuje projekty o wysokiej wartości naukowej. Doktorantka wykazała się także świetnym przygotowaniem literaturowym co szczególnie widoczne jest w sekcji „Dyskusja”, w której trzymane wyniki odniesione są krytycznie do opublikowanych danych.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Hanny Hołysz zatytułowanej: „Próba identyfikacji markerów raka piersi w oparciu o analizę polimorfizmów w genach ABCB1, *LEP* i *LEPR* oraz ocena roli glikoproteiny-P w odpowiedzi komórek linii raka piersi na działanie doksorubicyny” jest jednoznacznie pozytywna, a rozprawa w pełni spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami, zawartymi w art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 2003 r. Wnoszę więc o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu Pani mgr Hanny Hołysz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Rafał Sądej

