

Prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak

Instytut Biologii Eksperymentalnej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu

OCENA

rozprawy doktorskiej mgra biotechnologii Bartosza Słowikowskiego, zatytułowanej ***Estrogeny i palenie – analiza molekularnego mechanizmu komórkowego związanego z odpowiedzią na benzopiren i estradiol w niedrobnokomórkowym raku płuc***, wykonanej pod kierunkiem Pana prof. dra hab. Pawła Jagodzińskiego w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Rak płuc jest jednym z najczęściej występujących nowotworów zarówno wśród mężczyzn, jak i kobiet. Mimo licznych badań nad mechanizmem molekularnym prowadzącym do rozwoju jego różnych histologicznie typów, proces ten nie został poznany. Brakuje także swoistych markerów ułatwiających jego wczesne rozpoznanie. Wśród czynników uważanych za przyczyniające się do powstania i rozwoju raka płuc są takie, jak wdychanie azbestu, działanie związków organicznych, palenie papierosów. Ostatnie dane wskazują także na udział w tym procesie estrogenów, wśród których wyróżnia się estron, 17beta estradiol (E2), estriol, esterol. Dane literaturowe wskazują, że poziom stężenia 17beta estradiolu w tkance raka płuc jest podwyższony w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmienną, a ponadto obecność enzymów biorących udział w syntezie estrogenów oraz receptorów estrogenowych (ER) wskazuje na ważną rolę biologiczną estrogenów w funkcjonowaniu, rozwoju i regeneracji tkanki płuc.

Estrogeny oddziałują na komórki za pośrednictwem swoistych receptorów, aktywując transkrypcję licznych genów komórkowych tzw. szlaku genomowego oraz w szlaku niegenomowym, związanym z aktywacją receptorów estrogenowych zlokalizowanych w kaweolach czy związanych z białkiem, np. GPR30, prowadząc do aktywacji kinaz komórkowych. Receptory estrogenowe mogą być także aktywowane przez czynniki wzrostu i działać jak czynniki transkrypcyjne w tzw. szlaku niezależnym od liganda. Ponadto, w genomowym, jak i niegenomowym mechanizmie działania estrogenu bierze udział wielodomenowe białko PELP1. Łączy się ono z ER i wspomaga transport receptora estrogenowego do jądra komórkowego oraz wiązanie z elementem ERE w DNA, jak również może aktywować kinazy komórkowe. ER może także oddziaływać z receptorami dla węglowodorów aromatycznych, na przykład AhR. Estrogeny są metabolizowane wewnątrzkomórkowo przez enzymy z rodziny

cytochromów p450 (CYP1A1 czy CYP1B1) do związków katecholowych, których dalsze przemiany mogą prowadzić do uwolnienia wolnych rodników w efekcie uszkodzenia DNA, czy tworzenia adduktów. Enzymy CYP1A1 i CYP1B1 biorą także udział w przemianie wielopierścieniowych węglowodanów aromatycznych, w tym występujących w dymie papierosowym, co sugeruje, że enzymy te mogą pełnić istotną rolę w kancerogenezie indukowanej przez związki zawarte w dymie tytoniowym.

Złożony mechanizm działania estrogenów na komórki, w który zaangażowane są liczne cząsteczki komórkowe nie jest do końca poznany. Z tego względu podjęcie przez p. mgra Bartosza Słowikowskiego badań nad współdziałaniem estrogenów i pochodnych dymu tytoniowego w najczęściej diagnozowanym niedrobnokomórkowym raku płuc uważam za celowe i uzasadnione.

Realizację celu badań Doktorant rozpoczął od analizy ilościowej białek CYP1A1, CYP1B1, PELP1 i AhR na poziomie transkryptu oraz białka w tkance nowotworowej raka płuc, jak też w komórkach ustalonych linii komórkowych wywodzących się z niedrobnokomórkowego raka płuc (linia A549 i Calu-1) i prawidłowego nabłonka Beas-2b, inkubowanych benzo(a)pirenem (B(a)P) i/ lub E2. Następnie, podjął się zbadania wpływu katecholowych pochodnych 2-OH E2 oraz 4-OH E2, E2 i B(a)P, jak też E2 na proliferację i żywotność komórek niedrobnokomórkowego raka płuc, wykonując:

- oznaczenie poziomu E1 i E2 w badanym materiale klinicznym niedrobnokomórkowego raka płuc oraz w tkance płucnej niezmięnionej nowotworowo;
- określenie genotoksyczności 2-OH E2 i 4-OH E2, B(a)P oraz E2 w komórkach linii A549 z wyciszonym lub powielonym receptorem estrogenowym beta.

Materiał kliniczny pobrano z guzów pooperacyjnych od 75 pacjentów, leczonych w Klinice Torakochirurgii Wielkopolskiego Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu. Pacjenci nie byli wcześniej poddani chemio- i radioterapii. Wszystkie pobrane tkanki zostały dokładnie zbadane przez histopatologa i opisane. Analiza ekspresji genów białek PELP1, AhR, CYP1A1 oraz CYP1B1 w komórkach A549, Calu-1 i Beas-2b, hodowanych w obecności B(a)P i E2 na poziomie mRNA, jak też białka, wykazała, że dodatek do hodowli E2 o stężeniu 10nM spowodował znaczny statystycznie wzrost liczby komórek nowotworowych w hodowli zarówno w linii Calu-1, jak i A549 w porównaniu z hodowlą komórek kontrolnych Beas-2b. Podobny wynik Doktorant uzyskał, analizując stężenie E2 i jego prekursora E1 w tkankach nowotworowych niedrobnokomórkowego raka płuc pobranych od pacjentów do tkanki płucnej niezmięnionej nowotworowo. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze sugestie, że E2 może stymulować proliferację komórek raka płuc, a tym samym odgrywać istotną rolę w jego rozwoju. Ponadto, w tkance nowotworowej p. mgr Bartosz Słowikowski stwierdził wzrost ekspresji białka PELP1 zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Poziom tego białka nie zmienia się jednak w komórkach badanych linii pod wpływem E2, jak i B(a)P. W toku dalszych badań Doktorant wykazał, że poziom enzymów CYP1A1 i CYP1B1 biorących udział w przemianie E2 do jego katecholowych pochodnych -2-OHE2 oraz 4-OH E2 o silnym działaniu genotoksycznym może być zależny od receptora AhR. Ponadto, stosując test kometkowy wykazał, że 4-OH E2 może wiązać się z izoformą beta ER, a następnie jest transportowany do jądra komórkowego, gdzie oddziałuje z DNA. Doktorant wykazał także, że 4-hydroksylowa pochodna E2, w zależności od dawki, może hamować proliferację komórek linii Beas-2b i A540.

Interesujące są wyniki badań p. Bartosza Słowikowskiego na liniach komórkowych, które wykazały, że w komórkach wszystkich badanych linii po inkubacji z B(a)P zwiększa się stężenie zarówno mRNA, jak i białka CYP1A1 oraz CYP1B1. I tak, poziom CYP1A1 w

komórkach linii Calu-1 wzrastał 65-krotnie, a w A549 – 55-krotnie, natomiast CYP1B1 – 17-krotnie w Calu -1 i 7-krotnie w A549. Znacznie słabszy wzrost badanych enzymów, ale istotny, obserwowano w komórkach linii Beas-2B. Z kolei, poziom białka CYP1A1 i CYP1B1 w badanym materiale klinicznym był obniżony. Zgadzam się z sugestią autora pracy, że może to być efekt wyciszenia ekspresji obu genów w materiale klinicznym, pochodzących od palaczy, wskutek metylacji. Co warto byłoby potwierdzić doświadczalnie. Wyniki te wskazują także na złożoność mechanizmu molekularnego działania estrogenów w ciele człowieka, który różni się od obserwowanego w liniach komórkowych. Te bardzo cenne dane stanowią doskonały punkt wyjścia do dalszych badań nad rolą estrogenów i współdziałających z nimi cząsteczek komórkowych i ustrojowych w procesie indukcji i rozwoju raka płuc.

Jednym z regulatorów ekspresji obu badanych białek CYP jest AhR. Pan mgr Bartosz Słowikowski wykazał, że poziom transkrypcji tego białka pod wpływem E2 wzrasta w komórkach linii nowotworowych A549 i Calu-1. B(a)P jest antagonistą AhR, a jego wpływ na proliferację komórek był różny zależnie od wybranej linii i na przykład indukował proliferację komórek linii A549, natomiast hamował – Beas-2b i Calu-1. Wyniki te potwierdzają sugestie Doktoranta odnośnie złożoności badanych procesów, których przebieg jest odmienny w różnych typach komórek, na co mogą wpływać inne dodatkowe czynniki, związane na przykład z mechanizmem syntezy i degradacji estrogenów. Dane te wskazują również na synergistyczne działanie E2 i B(a)P, jednego ze składników dymu tytoniowego, co sprzyja syntezie enzymów CYP biorących udział w przemianie E2 i wzroście genotoksycznych pochodnych E2.

Analizując wyniki badań Doktoranta, uważam, że wytyczone na wstępie pracy cele badań zostały w pełni zrealizowane, a uzyskane dane znacznie poszerzają naszą wiedzę na temat kancerogenezy niedrobnokomórkowego raka płuc z udziałem E2 i pozwalają lepiej zrozumieć mechanizm molekularny tego złożonego procesu. Dane te są także bardzo istotne dla profilaktyki i terapii tego nowotworu.

Zaprezentowana do oceny praca została przedstawiona w formie 195-stronicowego wydruku komputerowego, w układzie typowym dla tego typu rozpraw. Część doświadczalną poprzedza 19-stronicowy Wstęp, którego lektura doskonale wprowadza czytelnika w zagadnienia stanowiące przedmiot badań Doktoranta. Rozdział ten jest oparty na najnowszej literaturze przedmiotu. Jasno przedstawione są cele pracy, które były następnie konsekwentnie przez Doktoranta realizowane. W drugiej części rozprawy p. mgr Bartosz Słowikowski opisuje stosowane w badaniach metody i materiał badawczy. Doktorant w badaniach stosował najnowsze techniki badawcze (tj techniki PCR, hodowle komórkowe, immunocytochemiczne, mikroskopowe), adekwatne do wytyczonych celów badań. Wyniki wszystkich doświadczeń są starannie udokumentowane na rycinach (73 rycin), fotografiach (16 fotografii) oraz zestawione w tabelach, co przy dużej liczbie danych znacznie ułatwia ich analizę. Bardzo dobrym rozdziałem pracy jest Dyskusja, w której wyniki badań własnych mgr Słowikowski dyskutuje z najnowszymi danymi z literatury przedmiotu. Świadczy ona o bardzo dobrym zrozumieniu przez Doktoranta badanych zagadnień. Rozprawę kończy jej streszczenie w języku polskim i angielskim, bogate piśmiennictwo (142 pozycje). Do pracy załączona jest stosowna zgoda komisji na prowadzenie badań.

Praca napisana jest poprawnie, jakkolwiek znalazło się w niej kilka skrótów myślowych i niejasności, jak np. na str. 61 – komórki, które odłączano od podłoża poprzez trypsynizację, gdzie Autor pracy pisze: „i policzono je przy użyciu błękitu tryptanu”. Również na str. 74 – barwiono przez 3 minuty buforem Ponceau. Proponuję także, aby zamiast pisać, że coś jest normalne, napisać raczej – prawidłowe. Prążki, o których Doktorant często pisze ana-

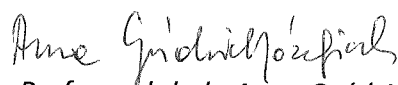
lizując rozdziały białek w żelu z udziałem elektroforezy, poprawniej byłoby nazywać frakcjami białek. Również na str. 168 – „wpływ E2 na poziom zarówno genu jak i białka”.

Wniosek końcowy

Przytoczone drobne niejasności nie mają wpływu na moją wysoką ocenę recenzowanej pracy. Uważam, że rozprawa mgra Bartosza Słowikowskiego jest bardzo interesująca i dostarcza szeregu danych odnośnie mechanizmu molekularnego działania estrogenów w procesie raka płuc oraz stanowi dobry punkt wyjścia do dalszych badań nad złożonym mechanizmem tego procesu. Poza wartością poznawczą, dane uzyskane przez Doktoranta mają istotne znaczenie dla profilaktyki i diagnostyki nowotworów płuc. W mojej ocenie rozprawa ta zasługuje na stosowne wyróżnienie.

Praca doktorska mgra biotechnologii Bartosza Słowikowskiego spełnia kryteria wymagane dla nadania stopnia naukowego doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne, określone w Ustawie z 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz Ustawie o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DzU nr 65, poz. 595 z późn. zm.), w brzmieniu ustalonym jako Ustawa z 18 marca 2011 roku (DzU nr 204) oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z 1 września 2011 roku.

Z powyższych względów, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgra Bartosza Słowikowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. zw. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak