



# UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej  
kierownik: prof. dr hab. Andrzej Gamian

Prof. dr hab. Andrzej Gamian  
ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław  
tel. (071)7841370, 7840084, fax: 7840085  
e-mail: [andrzej.gamian@umed.wroc.pl](mailto:andrzej.gamian@umed.wroc.pl); <http://www.am.wroc.pl>

Wrocław, 9.01.2020r.

## Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Bartosza Słowikowskiego pt. „Estrogeny i palenie – analiza molekularnego mechanizmu komórkowego związanego z odpowiedzią na benzopiren i estradiol w niedrobnokomórkowym raku płuc” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Pawła Jagodzińskiego

Praca dotyczy badania procesów prowadzących do rozwoju nowotworu płuc, w szczególności wpływu czynników takich jak estrogeny i substancje zawarte w dymie tytoniowym. Obejmuje analizę porównawczą tkanki nowotworowej i histopatologicznie nie zmienionej, pod względem kilku czynników na poziomie molekularnym, transkryptu i białka. Przedmiotem badania był materiał od pacjentów ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuc, najczęściej diagnozowanym typem raka płuc, a także komórki kilku linii komórkowych. Podjęty problem jest ważny, gdyż wyniki mogą posłużyć poprawieniu diagnostyki różnicowej różnych podtypów raka płuc, co może znaleźć przełożenie na terapię a także wytyczanie kierunków dla profilaktyki. Cząsteczkowe cele molekularne zostały właściwie dobrane do analiz. W przedstawionej do oceny pracy autor miał na celu wykazanie wpływu rakotwórczej pochodnej dymu tytoniowego, mianowicie benzopirenu, na metabolizm estrogenu E<sub>2</sub> oraz na właściwości jego receptora, a także wykazanie roli tego ksenobiotyku w zmianach ekspresji genów kodujących białka CYP1A1 i CYP1B1, PELP1 i AhR w niedrobnokomórkowym raku płuc. Białko bogate w prolinę kwas glutaminowy i leucynę (PELP1), cytochromy p450 i receptor AhR, będący uznanym markerem nowotworowym, są zaangażowane w metabolizm ksenobiotyków bądź w transformację nowotworową. Cząsteczki te, znane od szeregu lat, wciąż wymagają intensywnych badań i poszukiwania odpowiedzi na nowe pytania w tym zakresie. Postawienie takiego celu pracy było zasadne z punktu widzenia

biomedycznego i w pełni uzasadnione, a niniejsza praca jest częścią programu realizowanego w pracowni kierowanej przez Profesora Pawła Jagodzińskiego.

Praca ma typowy układ dla rozprawy doktorskiej, zawiera 198 stron maszynopisu, 78 rysunków, 14 tabel, dodatkowo załączono pozwolenie komisji bioetycznej. Osobno podano wykazy skrótów, rysunków, tabel i streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wnioski. Autor cytuje 142 pozycje piśmiennictwa.

We wstępie pracy autor najpierw omawia histopatologiczne typy raka płuc, po czym krótko przedstawia biosyntezę estrogenów także metabolizm katecholowych pochodnych estrogenów oraz rolę tych czynników, jak też rolę receptorów, w rozwoju nowotworu płuc. Opisuje też koaktywator receptora estrogenowego, białko bogate w prolinę kwas glutaminowy i leucynę PELP1. Następnie opisuje benzopiren jako jeden z wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych i enzymy je modyfikujące CYP1A1 i CYP1B1. Ważnym zagadnieniem opisanym w dalszej części wstępu jest działanie receptora węglowodorów aromatycznych AhR, biorącego udział w odpowiedzi komórki na ksenobiotyki. Rola CYP1A1 i CYP1B1 w powstawaniu i rozwoju raka płuc zamyka tę część pracy. Wstęp jest dobrze napisany, wprowadza czytelnika w zagadnienia będące przedmiotem badań. Na podkreślenie zasługuje własne opracowanie niemal wszystkich rysunków zamieszczonych w tej części pracy, co świadczy o dobrym zapoznaniu się autora z tematyką badań. Autor użył bogatego zestawu metod do realizacji zadań, dobrze i szczegółowo opisanych. Zastosowano metody hodowli komórkowych, oznaczania żywotności komórek z użyciem testu MTT, wydzielania i oznaczania RNA, reakcji PCR, oznaczania białka, elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS oraz metodę blotingu, wreszcie oznaczania estrogenu i pochodnych techniką spektrometrii masowej LCMS, oraz test na genotoksyczność. Wyniki są poddane analizie statystycznej. Dokumentacja wyników jest starannie opracowana i nie budzi zastrzeżeń. Autor wykazał wyższy poziom estrogenu  $E_2$  i stosunek  $E_2/E_1$  w tkance nowotworowej niż w niezmienionej nowotworowo, co wskazuje na potencjalne znaczenie w progresji agresywności nowotworów. Ponadto wykazał stymulację proliferacji komórek badanych linii nowotworowych przez benzopiren, zależność genotoksyczności pochodnej estrogenu 4-OH  $E_2$  od obecności ER $\beta$ , także potwierdził możliwość stymulowania przez benzopiren ekspresji CYP1A1 i CYP1B1. Ważną obserwacją jest indukujący wpływ  $E_2$  na ekspresję *AHR* w badanych komórkach linii nowotworowych, a także wykazanie obniżonej ekspresji *CYP1A1*, *AhR* i *CYP1B1* w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki histopatologicznie niezmienionej. Może to oznaczać obecność mechanizmu inhibicji tych cząsteczek. W tkance nowotworowej wykazano też



podwyższony poziom PELP1. Wyniki te wskazują, że istnieje synergia między paleniem papierosów a oddziaływaniem benzopirenu razem z estrogenami, sprzyjającym rozwojowi nowotworu płuc. Dyskusja została przeprowadzona przejrzyście, autor bardzo dobrze przeprowadził analizę wyników i odniesienie do danych literaturowych. Nasuwa się tutaj pytanie do doktoranta, czy wyniki otrzymane dla benzopirenu mogą być odniesione do dioksyn, które w oddziaływaniu z AhR mogą być neutralizowane kwasem acetylosalicylowym, co zresztą było wspomniane w dyskusji pracy odnośnie tokoferolu. Drugie pytanie dotyczy AhR, gdzie według doktoranta niejednoznaczne w odniesieniu do danych literaturowych, wyniki mogą być obciążone modyfikacjami potranslacyjnymi, czy glikacja może brać udział w funkcjonowaniu receptora, zważywszy na przypuszczalną obecność receptora RAGE na tych samych komórkach. Wyjaśnienie roli glikacji czynników białkowych analizowanych w pracy, może przybliżyć rolę niewyjaśnionych ich funkcji, być może uczestniczących w nowotworzeniu.

Nie mam uwag krytycznych do pracy, błędy literowe nieliczne zaznaczono na marginesie tekstu, tytuł jest zgodny z treścią pracy. Pod względem formy wszystkie części pracy są napisane przejrzyście. Zauważyłem jedynie kilka drobniejszych nieścisłości, które warto zaznaczyć, mianowicie o ile wiele metod opiera się w pracy na gotowych zestawach odczynnikowych, czy własnych opracowanych metodach, to jednak brakuje piśmiennictwa do kilku metod. Niepotrzebnie powtarzano niektóre odczynniki i używany sprzęt przy opisie kilku różnych metod. W tekście używano zapisu Western blot i wymiennie western blot, podczas gdy metodą jest Western blotting, a blot to uzyskany obraz. Konsekwencję w zapisie warto też stosować dla spektrometrii masowej, czasem zapisywanej jako spektrometria mas, lub dla testu kometkowego zapisywanego na str. 78 jako test kometowy. Dość swobodnie autor w opisie wyników odnosi czytelnika do poszczególnych rycin gdyż opisy w tekście nie zgadzają się z opisem pod rysunkami, co utrudnia śledzenie tekstu. Często brakuje całych lub części wyrazów czy jednostek pod rysunkami lub na obu osiach. Na str. 135 powinno być Tab. 12 a nie 11, na str. 140, lepiej napisać ruchliwość elektroforetyczna lub obraz elektroforetyczny niż rozdział elektroforetyczny pojedynczej komórki. Brak danych w zapisie pozycji 127 piśmiennictwa. Na stronie 43 w opisie do ryciny 11 w zdaniach są braki tekstu. Na rycinie 17 i 18 brak jednostki obszaru pod wykresem. Uwagi powyższe nie umniejszają wartości pracy, ale mogą być pomocne w redagowaniu manuskryptu.

Podsumowując chcę podkreślić, że praca jest wartościowa, badania zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane, praca wnosi oryginalny wkład do wiedzy o mechanizmach rozwoju nowotworów płuc, stanowi podstawę do dalszych badań białek zaangażowanych w patogenezę

raka płuc, a także nad nowymi aspektami, na przykład roli glikacji w tych procesach, czy badań mogących też uwzględniać aminoacylację jako sygnał komórkowy. Autor uzyskał bardzo dobre wyniki dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod i dużego wkładu pracy, co dowodzi bardzo dobrego opanowania warsztatu badawczego. Autor wykazał się znajomością właściwie wykorzystanego piśmiennictwa, na uwagę zasługuje bardzo dobre opanowanie metod badań komórkowych, immunochemicznych i genomicznych. Rozprawa jest utrzymana w dobrym standardzie badań interdyscyplinarnych.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Bartosza Słowikowskiego zawiera oryginalny materiał doświadczalny i spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Dlatego wnioskuję do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr Bartosza Słowikowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
KATEDRA I ZAKŁAD  
BIOCHEMII LEKARSKIEJ  
Kierownik  
prof. dr hab. Andrzej Gamian