

Prof. dr hab. med. Urszula Demkow
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieków Rozwojowych
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Recenzja pracy doktorskiej

Mgr Kingi Henryki Nowackiej pt: "Cząsteczka APRIL w regulacji proliferacji i apoptozy komórek raka płaskonabłonkowego nowotworów głowy i szyi."

Przedstawiciele cytokin rodziny czynnika martwicy nowotworu pełnią bardzo istotne funkcje biologiczne. Działając poprzez białka receptorowe indukują szeroki zakres odpowiedzi na sygnały. Wiele spośród sygnałów przekazywanych przez receptory modyfikuje procesy związane z programowaną śmiercią komórki czy też z jej dojrzewaniem, różnicowaniem, proliferacją i migracją. Rodzina białek receptorowych TNF posiada jedną lub kilka domen zewnątrzkomórkowych bogatych w cysteinę. Każdy z tych regionów tworzy powiązaną mostkami dwusiarczkowymi domenę rdzeniową, w postaci trójwymiarowej struktury tworzącej kieszeń wiążącą ligand. APRIL (ligand indukujący proliferację, ang. A Proliferation Inducing Ligand) należy do grupy białek rodziny TNF. Badania nad ekspresją i funkcją APRIL sugerują, że białko to jest wykorzystywane przez komórki nowotworowe do indukowania proliferacji. Obserwacje naukowców wskazują, że APRIL wiąże się z receptorem, który jest także obecny na komórkach nowotworowych, prowadząc do autowydzielniczej lub parawydzielniczej aktywacji komórek nowotworowych. Dodatkowo, aktywacja czy blokowanie drogi APRIL może mieć znaczenie w terapii guzów stanowiąc istotny cel dla nowych leków poprzez wpływ na równowagę pomiędzy proliferacją, a śmiercią komórek. Podobnie, APRIL może brać udział patogenezie chorób o podłożu zapalnym czy autoimmunizacyjnym (np. toczeń rumieniowaty układowy). Wybór tematu pracy ma więc istotne znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne.

Zasadniczym celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu oraz zaproponowanie mechanizmu działania cząsteczki APRIL na proliferację i czas przeżycia komórek raka płaskonabłonkowego głowy i szyi.

Przedstawiona praca ma typowy układ rozpraw na stopień doktora nauk medycznych. Starannie przygotowany maszynopis pracy liczy 106 stron, jest podzielony na 9 rozdziałów, opatrzony jest 47 czytelnymi rycinami, oraz 9 tabelami i zawiera zestawienie 172 pozycji piśmiennictwa.

We wstępie Doktorantka przedstawiła szczegółowe informacje o nadrodzinie TNF, w tym o cząsteczce APRIL i jej udziale w różnych procesach biologicznych. Wstęp dobrze uzasadniał podjęcie tematu pracy. Badania przeprowadzono *in vitro* na 3 liniach komórek z grupy nowotworów głowy i szyi. Opisano zasady prowadzenia hodowli badanych linii komórkowych. Ocenę proliferacji przeprowadzono za pomocą testu MTT. Ocenę żywotności i apoptozy oceniono metodą cytometrii przepływowej klasyczną metodą z zastosowaniem Aneksyny 5. Za pomocą techniki western blot oceniono ekspresję białek powiązanych ze zjawiskiem apoptozy. W pracy nie opisano analizy statystycznej otrzymanych wyników.

Wyniki przedstawiono na czytelnych wykresach. Na podstawie eksperymentów badawczych Doktorantka stwierdziła, że rekombinowana cząsteczka APRIL stymuluje proliferację komórek linii FaDu, SCC-9 i CAL27 po 24 i 48 h hodowli. Oceniając wyniki pracy warto by było jednak przedyskutować ograniczenia testu MTT w ocenie proliferacji/żywotności komórek. Mimo, że test MTT jest szeroko stosowany do oceny proliferacji komórek, w przypadku niektórych układów doświadczalnych redukcja MTT podlega wpływom czynników dając fałszywe wyniki które są źródłem błędnej interpretacji. Badane związki mogą bezpośrednio zakłócać aktywność dehydrogenazy mitochondrialnej lub indukować wewnątrzkomórkową generację ROS i prowadzić do przeszacowania lub niedoszacowania wyników testu MTT. Także związki, które wpływają na uszkodzenia błony komórkowej zmniejszają usuwanie MTT co może prowadzić do błędnych wniosków dotyczących żywotności hodowli komórkowych. Te problemy warto byłoby przedyskutować odnosząc się do otrzymanych wyników. W toku eksperymentów badawczych wykazano także, że APRIL hamuje apoptozę nie wpływając na nekrozę komórek. Metodą western blot oceniono ekspresję białek powiązanych ze zjawiskiem apoptozy. Wykazano, że rhAPRIL hamuje produkcję BAK i Bax w komórkach badanych linii. rhAPRIL po 48 h hodowli pobudzał produkcję Bcl-2 Bcl-xL w badanych komórkach. rhAPRIL hamował również produkcję kaspazy 3 przez 2 z 3ch badanych linii komórkowych oraz produkcję kaspazy 9 przez komórki wszystkich linii komórkowych. Wyniki zostały przedstawione na czytelnych

wykresach, natomiast rozdziały komórkowe na preparatach z elektroforezy są niewyraźne i warto poprawić jakość zdjęć przed oddaniem pracy do druku. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów wykazano także, że synteza białka PI3K jest hamowana przez rhAPRIL, natomiast uwalnianie białka p-Akt1/2/3 i surwiwiny jest pobudzane.

W zwięzłym rozdziale dyskusja Autorka ustosunkowała się do otrzymanych wyników w świetle doniesień innych autorów wskazujących na udział białka APRIL w procesie rozwoju nowotworów oraz istnienie zależności pomiędzy stężeniem cząsteczki APRIL a markerami nowotworowymi CEA i CA19-9. W pracy autorka dyskutuje pobudzające działanie APRIL na proliferację komórek oraz zaobserwowane różnice w odpowiedzi na APRIL przez różne linie nowotworowe, co jest bardzo interesujące. Obserwacje doktorantki są zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy potwierdzają udział cząsteczki APRIL w stymulacji proliferacji oraz hamującym działaniu na apoptozę. Doktorantka dyskutuje również zjawisko hamowania produkcji antyapoptotycznych białek przez APRIL. Autorka obserwuje różnice w odpowiedzi na rhAPRIL przez różne linie komórkowe i wysuwa uzasadnioną hipotezę, że obserwowane różnice mogą wynikać z uruchomienia odrębnych ścieżek sygnałowych w różnych badanych liniach. Autorka badała również wpływ rhAPRIL na ekspresję kaspazy 3. Pomimo, iż badana kaspaza odgrywa istotną rolę w procesie apoptozy, wpływ APRIL na jej syntezę nie był znaczący. Doktorantka dyskutuje także wpływ APRIL na szlak kinazy p-Akt 1/2/3 pobudzający w przypadku linii FaDu i SCC-9 a hamujący na CAL-27. Przyczyna tych różnic nie jest jasna. Autorka sugeruje, że Akt jest przyczyną spadku ekspresji surwiwiny co powoduje oporność na apoptozę. Zjawisko to wymaga dalszych badań.

Pracę kończy 7 dobrze sformułowanych wniosków wypływających z wyników pracy. Autorka słusznie podkreśla, że APRIL działa pronowotworowo, a największą wrażliwość na tę cząsteczkę przejawia linia SCC-9, co czyni ją najlepszym modelem do dalszych badań. Autorka słusznie podkreśla udział odrębnych szlaków sygnałowych w przypadku różnych, badanych linii.

Podsumowując, przedstawioną mi do recenzji pracę doktorską oceniam bardzo dobrze. Rozprawa niewątpliwie zachęca do kontynuowania badań dotyczących opisywanych problemów. Aktualne leczenie wielu typów nowotworów, w tym raka płaskonabłonkowego głowy i szyi, jest mało skuteczne, przeżywalność w przypadku nieoperacyjnych guzów jest niska, a leki i ich kombinacje są toksyczne. Zatem istnieje potrzeba zidentyfikowania nowych punktów uchwytu dla innowacyjnych terapii hamujących wzrost nowotworu. Jedną z

potencjalnych możliwości jest zastosowanie antagonistów ścieżki APRIL, na przykład przeciwciał przeciwko APRIL, blokerów receptora dla APRIL, rozpuszczalnych białek fuzyjnych anty-receptor APRIL-Ig itp. Przedstawiona do oceny praca doktorska niewątpliwie zachęca do stawiania dalszych pytań dotyczących opisywanego zagadnienia.

W oparciu o przedstawioną analizę stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Mgr Kingi Henryki Nowackiej pt: "Cząsteczka APRIL w regulacji proliferacji i apoptozy komórek raka płaskonabłonkowego nowotworów głowy i szyi" spełnia kryteria uprawniające do nadania stopnia doktora w obszarze nauk medycznych. Tym samym zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie Mgr Kingi Henryki Nowackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab n. med. Urszula Demkow

