

Prof. dr hab. Jan Pachecka

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Recenzja pracy doktorskiej

pt. „Rola tlenu węgla w regulacji apoptozy w komórkach raka sutka MCF-7”
wykonanej przez Pana mgr Pawła Drągowskiego pod kierunkiem
Pana dr hab. Wojciecha Mityka w Samodzielnej Pracowni Analizy Leków
Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Nadrzędnym celem badań ocenianej rozprawy doktorskiej było poszukiwanie nowych potencjalnych celów farmakoterapii raka piersi poprzez określenie wpływu donora tlenu węgla (CORM-2) na metabolizm kolagenu oraz proces apoptozy w komórkach estrogenozależnego nowotworu gruczołu piersiowego MCF - 7. Problematyka badawcza pracy jest aktualna i bardzo ważna ze względów poznawczych oraz praktycznych.

Maszynopis rozprawy (101 stron) ma układ typowy dla prac doktorskich o charakterze prac eksperymentalnych. Autor rozprawy zachował prawidłowe proporcje między częścią teoretyczną i częścią praktyczną pracy. Merytoryczną część pracy poprzedza wykaz stosowanych w tekście skrótów, rozwiniętych w języku polskim i angielskim.

Część teoretyczna pracy zatytułowana „Wstęp” została podzielona na 3 rozdziały poświęcone w kolejności: problemom apoptozy, kolagenu i tlenu węgla. W rozdziale zatytułowanym „Apoptoza” Doktorant przedstawił najważniejsze informacje dotyczące wewnątrzpochoдного i zewnątrzpochoдного szlaku apoptozy oraz czynników pobudzających apoptozę.

Rozdział zatytułowany „Kolagen” przedstawia informacje poświęcone strukturze i metabolizmowi kolagenu oraz czynnikom odgrywającym istotną rolę w regulacji metabolizmu tego białka ze szczególnym uwzględnieniem roli prolidazy w tym procesie.

Kolejny rozdział zatytułowany „Tlenek węgla” został poświęcony omówieniu toksyczności CO, endogennym źródłom tlenu węgla, znaczeniu tlenu węgla w procesach fizjologicznych oraz syntetycznym donorom tej wewnątrzkomórkowej cząsteczki sygnałowej.

Informacje przedstawione w tej części pracy świadczą o tym, że Doktorant zapoznał się z aktualnym piśmiennictwem w zakresie rozprawy oraz dokonał prawidłowej selekcji informacji, które umożliwiły sformułowanie ogólnego problemu oraz określenie celu badawczego rozprawy doktorskiej. Cel pracy został sformułowany dobrze w oparciu o aktualne dane literaturowe oraz doświadczenie i wyniki badań własnych zespołu kierowanego przez promotora przewodu doktorskiego.

Realizacja badań mających na celu uzyskanie celu pracy obejmowała wykonanie dobrze zaplanowanych badań dotyczących, w pierwszym etapie, wpływu donora tlenu węgla CORM-2 (dimer trikarbonylodichlororutenu (II)) na przeżywalność komórek raka sutka MCF-7, a następnie na biosyntezę DNA, proces apoptozy, biosyntezę kolagenu, aktywność prolidazy, ekspresję receptora- integrynowego, ekspresję receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF – IR), ekspresję czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, ekspresję dehydrogenazy prolinowej / oksydazy prolinowej (PRODH / POX), ekspresję kaspazy 9 i kaspazy 3 oraz ekspresję białek 5 i 7 związanych z procesem autofagii (Atg5, Atg7) w komórkach raka sutka MCF-7.

Badania zostały zaplanowane i zrealizowane prawidłowo z wykorzystaniem dobrze dobranych metod i technik badawczych. Opis metod zamieszczonych w rozdziale „Materiał i metody” obejmuje charakterystykę procedury hodowli estrogenozależnych komórek raka sutka MCF – 7 zakupionych w amerykańskim banku komórek ATCC (American Type of Culture Collection), metody wykonania testu cytotoksyczności, metody radiometrycznej pomiaru biosyntezy DNA, metody Lowry oznaczania białek w homogenatach komórkowych, metody oznaczania biosyntezy kolagenu, procedurę elektroforetycznego rozdzielania białek na żelu poliakrylamidowym w obecności SDS, procedurę analizy białek metodą „Western Immunoblot”, procedurę analizy poziomu tioli komórkowych przy użyciu systemu NucleoCounter NC-3000, metodykę oznaczania aktywności białek przekaźnikowych uczestniczących w regulacji przeżywalności komórek przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego BD Pathway 855.

Uważam, że wymienione metody zostały dobrane prawidłowo i wykonane zgodnie ze współczesnymi standardami prowadzenia laboratoryjnych badań naukowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorant stwierdził, że aktywna forma donora tlenu węgla CORM-2 wywołuje zależne od stężenia obniżenie przeżywalności komórek raka sutka MCF-7. Logicznym było pytanie czy efekt ten jest wywołany obniżeniem intensywności biosyntezy DNA. Przeprowadzone badania wykazały, że CORM-2 w stopniu zależnym od stężenia hamuje proces inkorporacji znakowanej [3 H]- tymidyny do DNA.

Dalsze badania wykazały, że CORM-2 w niższych stężeniach (do 100 μ M) indukuje apoptozę natomiast w stężeniu 200 μ M wywołuje działanie nekrotyczne.

Następny etap badań był poświęcony określeniu wpływu CORM-2 na procesy związane z biosyntezą kolagenu. Wykazano, że CORM-2 zależnie od użytego stężenia hamował biosyntezę kolagenu mierzoną ilością 5[3 H]-proliny wbudowanej do białek stanowiących substrat dla kolagenazy bakteryjnej.

Innym badanym parametrem była aktywność prolidazy, enzymu odpowiedzialnego za dostępność proliny do biosyntezy kolagenu. Przy wyższych testowanych stężeniach (50 μ M i 100 μ M), CORM-2 powodował wzrost aktywności prolidazy odpowiednio o 37% i 38%.

Celem wyjaśnienia poczynionych obserwacji Doktorant badał wpływ CORM-2 na poziomie szlaków sygnałowych generowanych w wyniku pobudzenia receptora β 1-integrynowego oraz receptora IGR-IR i stwierdził, że badany donor tlenu węgla w stężeniu 100 μ M hamuje ekspresję obu badanych receptorów, odpowiednio o 40% i 26%.

W badaniach wpływu CORM-2 na ekspresję czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w komórkach MCF-7 wykazano, że związek ten w sposób zależny od stężenia indukował ekspresję badanego czynnika wzrostu, przy czym w stężeniu 100 μ M indukcja ekspresji wynosiła 100%. CORM-2 w stężeniach 50 μ M i 100 μ M powodował obniżenie ekspresji oksydazy prolinowej odpowiednio o 45% i 71%.

Doktorant stwierdził również, że pod wpływem donora tlenu węgla w rosnących stężeniach następuje zwiększenie ekspresji aktywnych i całkowitych form kaspaz odgrywających ważną rolę w procesach aktywacji szlaków apoptozy : kaspazy 9 (kaspaza inicjatorowa) oraz kaspazy 3 (kaspaza wykonawcza).

Przejrzyste omówienie uzyskanych wyników oraz merytoryczna dyskusja oparta na znajomości bogatego piśmiennictwa (około 180 pozycji, głównie w języku angielskim z ostatnich kilkunastu lat) świadczą o dojrzałości naukowej Doktoranta.

Przedstawione wnioski są adekwatne do uzyskanych wyników otrzymanych podczas realizacji części eksperymentalnej pracy.

Uważam, że recenzowana praca wnosi nowe oryginalne dane do problematyki wpływu tlenu węgla na wybrane parametry metabolizmu kolagenu i regulacji apoptozy w komórkach raka sutka MCF-7 oraz świadczy, że Autor rozprawy posiada umiejętność formułowania i podejmowania prób rozwiązywania problemów naukowych w oparciu o badania eksperymentalne.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „Rola tlenu węgla w regulacji apoptozy w komórkach raka sutka MCF-7” wykonana przez Pana mgr Pawła Drągowskiego pod kierunkiem Pana dr hab. Wojciecha Miłyka spełnia ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim, dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie Autora pracy do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Jan Pachecka