Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8
Lublin 20-950
tel. (81) 724 44 31, (81) 724 42 93
fax (81) 724 48 23
kierownik:
Prof. dr hab. Janusz Milanowski

Department of Pneumonology, Oncology and Allergology
Medical University of Lublin
Poland, Lublin 20-950
Jaczewskiego 8
tel. (+48-81) 724 44 31, (+48-81) 724 42 93
fax (+48-81) 724 48 23
Head:
Prof. Janusz Milanowski MD, PhD

e-mail: pulm.dept@am.lublin.pl

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 12 05 2016
L. dz. 212/16

OCENA

ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA

MGR INŻ. EWY MAJ

PT. "MECHANIZM REGULUJĄCY WSPÓŁDZIAŁANIE ANALOGU WITAMINY D W ŁĄCZNYM STOSOWANIU Z CYTOSTATYKAMI I INHIBITORAMI KINAZ TYROZYNOWYCH W MODELU NIEDROBNOKOMÓRKOWEGO RAKA PŁUCA"

Rak płuca jest najczęściej diagnozowanym nowotworem na świecie stanowiącym najczęstszą przyczynę śmierci wśród mężczyzn, a w krajach wysoko rozwiniętych również wśród kobiet. Rokowane w tej chorobie jest niekorzystne, a odsetki przeżyć 5-cio letnich w stadiach zaawansowanych są niewielkie, szczególnie w przypadku nowotworu nieoperacyjnego w stadium IIIB i IV, kiedy to nie przekraczają kilku procent. Poza prewencją mającą na celu ograniczenie wpływu czynników środowiskowych, takich jak narażenie na dym tytoniowy oraz azbest, podejmowane są próby identyfikacji nowych celów terapeutycznych oraz efektywniejszych sposobów leczenia. Aktualnym tematem badań jest również identyfikacja nowych cząsteczek, które stosowane łącznie z istniejącymi terapiami mogą zwiększać ich efektywność.

W tę niezwykle ważną tematykę wpisuje się przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Ewy Maj. Autorka podjęła się zbadania mechanizmów współdziałania analogów witaminy D z inhibitorami wielokinazowymi: imatynibem i sunitynibem

stosowanymi łącznie z cisplatyną i docetakselem w linii komórkowej raka gruczołowego A549 oraz w modelu mysim zaszczepionym tymi komórkami. Autorka w hodowlach komórkowych zbadała stopień zahamowania proliferacji i apoptozę komórek nowotworowych oraz ekspresję w nich kaspazy 3, białek p53 i p21 oraz wielu innych w zależności od zastosowanych kombinacji badanych związków chemicznych. Ponadto określiła zdolność komórek nowotworowych do wytwarzania VEGF i PDGF. Doszła do wniosku, że badane pochodne witaminy D potęgują *in vivo* działanie przeciwnowotworowe imatynibu i sunitynibu.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma układ typowy dla tego typu opracowań. Liczy 162 strony maszynopisu, w tym 18 tabel i 48 rycin. Całość pracy opatrzona jest 211 pozycjami piśmiennictwa, z czego większość została opublikowana w międzynarodowych, recenzowanych czasopismach. Niestety w pracy brakuje aktualnego piśmiennictwa z ostatnich 5 lat (tylko kilka pozycji z lat 2013-2015).

Zasadniczą część rozprawy poprzedza streszczenie w języku polskim i angielskim. Dla tak obszernego opracowania streszczenia są zbyt lakoniczne (1 strona wydruku komputerowego).

Wstęp poprzedzony został objaśnieniem stosowanych przez Autorkę skrótów. W liczącym 20 stron „Wstępie" Autorka przestawiła dane dotyczące epidemiologii raka płuca oraz zasad leczenia tej choroby w zależności od rozpoznania patomorfologicznego i stopnia zaawansowania, ze szczególnym uwzględnieniem predyspozycji genetycznych do zastosowania terapii ukierunkowanych molekularnie oraz neoangiogenezy i możliwości zastosowania terapii antyangiogennych w raku płuca. Bardzo szeroko i z dużą wiedzą Autorka opisuje aktywność przeciwnowotworową witamy D oraz jej roli w rozwoju raka płuca. We „Wstępie" brakuje aktualnych danych epidemiologicznych oraz aktualnego oddziału patomorfologicznego raka płuca. Oprócz analizy częstości występowania raka płuca przeprowadzonych rzez Państwowy Zakład Higieny (rok 2012) należy uwzględnić dane

Krajowego Rejestru Nowotworów (rok 2014). W roku 2015 ukazała się drukiem nowa klasyfikacja WHO nowotworów płuca, opłucnej, grasicy i serca. Brakuje także krótkiego wprowadzenia o klasyfikacji TNM stopni zaawansowania raka płuca z opisem obrazowych metod oceny lokalizacji guza i przerzutów (w kolejnych rozdziałach Autorka przyporządkuje możliwości zastosowania terapii do różnych stopni zaawansowania nowotworu).

Cele pracy zostały sformułowane w sposób jasny i odpowiadający założeniom metodologicznym pracy.

W rozdziale „Materiał i Metody", liczącym 25 stron, mgr inż. Ewa Maj opisuje stosowaną metodykę doświadczalną. Badania przeprowadzone zostały przy wykorzystaniu hodowli linii komórkowych: A549 ludzkiego gruczolakoraka płuca i HLMEC ludzkich komórek śródbłonka naczyń oraz mysiego modelu raka gruczołowego płuca. Oceniono wpływ imatynibu, sunitynibu, cisplatyny, docetakselu, kalcytriolu, takalcytolou oraz kalcypottriolu stosowanych w różnych kombinacjach na hodowane komórki oraz myszy zaszczepione komórkami A549. W ocenie tej wykorzystano test zahamowania proliferacji za pomocą metody kolorymetrycznej, analizę faz cyklu komórkowego, apoptozy i martwicy komórek za pomocą jodku propidyny i cytomteru przepływowego, ocenę aktywności kaspazy 3 z wykorzystaniem metody fluorymetrii, analizę stężenia VEGF i PDGF metodą ELISA oraz analizę ekspresji kilkudziesięciu białek, mających wpływ na proliferację i apoptozę komórek za pomocą metody western blot, immunofluorescencji i real-time PCR. Ponadto Autorka oceniła aktywność przeciwnowotorową badanych związków w mysim modelu zwierzęcym (myszy szczepu NOD/SCID zaszczepione komórkami A549). Opisowi metodyki towarzyszą liczne tabele, wskazujące na bardzo dobre opanowanie stosowanych metod badawczych. Jedynym poważniejszym mankamentem tego rozdziału jest brak zbiorczej tabeli informującej w jakich kombinacjach zostały użyte badane substancje w poszczególnych eksperymentach (to przekłada się także na zmniejszenie czytelności wyników). Preferowana jest także polska pisownia nazw leków (np. imatynib zamiast imatinib) Pomimo tych drobnych błędów

nomenklaturowych, należy zwrócić uwagę na zastosowanie przez Autorkę nowoczesnego warsztatu badawczego, na który składają się bardzo zróżnicowane metody z zakresu immunologii i genetyki, a także hodowli komórkowej i prowadzenia doświadczeń na modelach zwierzęcych.

W rozdziale „Wyniki", który stanowi najobszerniejszą część pracy (60 stron), Autorka przedstawia rezultaty poszczególnych eksperymentów uzupełniając je licznymi i dobrze opracowanymi tabelami i rycinami.. Autorka w tym rozdziale nie ustrzegła się drobnych błędów stylistycznych i nomenklaturowych, co jednak nie umniejsza wartości uzyskanych wyników. Jedyne zastrzeżenie budzi różnorodność kombinacji substancji czynnych zastosowanych w eksperymencie. Np. w eksperymencie *in vivo* różne dawki analogów witaminy D stosowane są łącznie z monoterapią imatynibem, natomiast w eksperymencie *in vivo* z udziałem analogów witaminy D i sunitynibu pojawia się dodatkowo kombinacja tych dwóch substancji z docetakselem (taka kombinacja powinna znaleźć się także w eksperymencie w którym stosowany był imatynib i analogi witaminy D). Powinny pojawić się zbiorcze tabele w zwięzły sposób podsumowujące sposób działania poszczególnych kombinacji. Dla przejrzystości wyników oraz w przypadku planowania publikacji wartościowe byłoby ujednolicenie tej części wyników. Autorka sformułowała aż 12 punktów podsumowujących wyniki oraz 10 wniosków zazwyczaj związanych z uzyskanymi wynikami. Najważniejsze z nich dotyczą obserwacji, że analogi witaminy D nie wpływają na działanie antyproliferacyjne cytostatyków i inhibitorów wielokinazowych, ale potęgują działanie przeciwnowotworowe tych substancji w modelu mysim raka gruczołowego. Kolejny ważny wniosek wynika z obserwacji, że zastosowanie łączne inhibitorów wielokinazowych z niektórymi analogami witaminy D może wpływać w sposób hamujący na neoangiogenezę zarówno poprzez zmniejszenie wytwarzana VEGF, jak i poprzez wpływ na komórki śródbłonka. Niektóre wnioski maja charakter spekulatywny i nie wynikają bezpośrednio z wyników pracy (np. wniosek 3 lub 8).

Uzyskane wyniki zostały omówione w „Dyskusji", która liczy 20 stron. Autorka wykazał się dobrą znajomością przedmiotu oraz obiektywizmem w ocenie własnych wyników. Dyskusja ściśle dotyczy przedmiotu przeprowadzonych badań. Zaznaczyć należy, że zrealizowane badania stały się podstawą zgłoszenia patentowego, a badania były w części finansowane z grantu Preludium NCN

Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora. Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr inż. Ewy Maj do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuje o wyróżnienie rozprawy doktorskiej, jeśli doktorantka spełnia pozostałe kryteria „Regulaminu wyróżniania rozpraw doktorskich" Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Lublin, 5.05.2016.

1124262

Prof. dr hab. n. med. Paweł Krawczyk
lekarz chorób wewnętrznych
specjalista laboratoryjnej genetyki medycznej
specjalista laboratoryjnej immunologii medycznej