

*Prof. dr hab. Ryszard Oliński
Katedra Biochemii Klinicznej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medium im. L. Rydygiera w Bydgoszczy*

Ocena rozprawy na stopień doktora nauk medycznych mgr Aleksandry Poterały – Hejmo
„Rola białka P53 w regulacji stanu oksydoredukcyjnego w komórkach nowotworowych”

Choroby nowotworowe w długo żyjących społeczeństwach są najczęściej główną przyczyną zgonów. W Polsce na nowotwory złośliwe zapada każdego roku ponad 120 tys. osób. W ostatnich latach obserwuje się niezwykle dynamiczny rozwój badań nad poznaniem molekularnych mechanizmów powstawania nowotworów. Nowotwór powstaje w wyniku zaburzeń kontroli proliferacji, co z reguły prowadzi do niestabilności genomu i gromadzenia się błędów genetycznych o charakterze dominującym, bądź recesywnym. Rozwój nowotworów u ludzi jest procesem wieloetapowym, a jedna z podstawowych zmian dotyczy zdarzeń mutacyjnych w protoonkogenach i genach supresorowych takich jak gen p53. Nowotwory stanowią jednak nadal wyzwanie dla badań naukowych, ponieważ złożoność zjawisk leżących u podstaw procesu nowotworzenia, zwłaszcza na poziomie molekularnym, wciąż rodzi nowe pytania.

Rak jelita grubego jest jednym z najczęściej występujących nowotworów w krajach wysoko uprzemysłowionych, a jego wczesne wykrycie znacznie zwiększa szansę wyleczenia. Niezwykle istotne wydaje się więc poszukiwanie nowych czynników prognostycznych i obiektywizacja dotychczasowych kryteriów pozwalających na rokowanie przebiegu choroby. Dotychczas stosowane czynniki prognostyczne w przypadku raka jelita grubego nie są w pełni zadowalające, dlatego obiecujący jest nurt badań dotyczący poszukiwania zależności między stanem oksydoredukcyjnym a funkcją białka p53 i jej wpływ na proces onkogenezy.

Rozprawa ma układ przejrzysty, napisana jest dobrym językiem, a wyniki ujęte są w czytelnych tabelach i na rycinach. Praca ma typowy układ charakterystyczny dla prezentacji badań eksperymentalnych.

„Wstęp” stanowi bardzo dobre i wyczerpujące wprowadzenie do zagadnień będących przedmiotem rozprawy. W części teoretycznej znalazły się, jak się wydaje, wnikliwe informacje dotyczące szeroko ujętych zagadnień opisujących środowisko oksydoredukcyjne w komórce i charakteryzujące białko/gen P53. Nie bez znaczenia jest jasny i klarowny język, jakim Doktorantka posługuje się przy opisie niejednokrotnie trudnych i specjalistycznych zagadnień.

Mimo, że temat recenzowanej monografii jest intensywnie eksploatowany, w literaturze można znaleźć kilka tysięcy prac poświęconych znaczeniu zmian genu/białka *TP53* w raku jelita (baza *PubMed*), Autorka dostrzegła lukę w dostępnej nam wiedzy i starała się ją uzupełnić wynikami opisanymi w rozprawie.

Podstawowym celem pracy, określonym tytułem rozprawy, była odpowiedź na pytanie w jaki sposób białko P53 reguluje produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach ludzkiego nowotworu jelita grubego. Ten ambitny cel został rozpisany na kilka celów szczegółowych, z których jak się wydaje najciekawszymi były analizy mikromacierzowe związane z identyfikacją P53 zależnych genów i badania wpływu białka P53 na morfologię i funkcję mitochondriów.

Ze szczególnym uznaniem pragnę podkreślić fakt, że do realizacji celów badań Doktorantka zastosowała bardzo trafnie spektrum nowoczesnych technik i testów. Zwraca uwagę logiczny i konsekwentny zestaw analiz i metodyki umożliwiających takie analizy; zaczynając od analizy cyklu komórkowego z zastosowaniem cytofluorometru przepływowego, badanie wewnątrzkomórkowego poziomu RFT analizy, kardiolipiny i potencjału błony mitochondrialnej poprzez analizy mikromacierzy, ekspresji genów, poziomu mtDNA, i analizy poziomu białek metodą Western Blot aż po użycie mikroskopii

elektronowej , co pozwoliło na uzyskanie eleganckich zdjęć ultrastruktury komórek i gęstości elektronowej mitochondriów. Dobór metodyki pozwolił na pełną realizację ambitnych celów pracy

Nie będę w recenzji koncentrował się na szczegółowym omawianiu wyników doktoratu. Czytelnik, który chciałby chociażby pobieżnie zaznajomić się z rezultatami znajdzie je zarówno w streszczeniu zamieszczonym na początku pracy, jak i w rozdziale 7 „Wnioski” zamieszczonym tradycyjnie na końcu rozprawy. Chciałbym natomiast z uznaniem podkreślić ogrom pracy i dużą ilość zgromadzonych w rozprawie interesujących rezultatów, jak i rzadkie na tym etapie rozwoju naukowego krytyczne podejście do wyników. Tej polemice towarzyszy przejrzystość i logika prowadzonych wywodów naukowych.

Przechodząc do merytorycznej oceny pracy chciałbym podkreślić, że wszystkie opisane w syntetycznej formie, w rozdziale 7. („Wnioski”) rezultaty badań są w pełni oryginalnymi osiągnięciami naukowymi.

Sądzę, że oryginalność wyników recenzowanej pracy jest jasno zilustrowana na schemacie „P53-zależnej regulacji warunków oksydoredukcyjnych w komórkach nowotworu jelita grubego (...) „ zamieszczonym na Ryc 38, który to rysunek jest jednocześnie eleganckim podsumowaniem wyników. Spośród wielu znaczących szczegółowych rezultatów składających się na rozprawę doktorską mgr Aleksandry Poterały – Hejmo należy przede wszystkim wymienić;

- Rezultaty wskazujące na obniżenie poziomu ekspresji FOXO1 w komórkach z pozbawionych pełnej formy białka P53;
- Towarzyszące w/w zjawisku obniżenie ekspresji genów kodujących białka regulujące warunki oksydoredukcyjne;
- Identyfikacja miRNA, których poziom ulega zmianie w komórkach pozbawionych pełnej formy białka P53 i weryfikacja wpływu miRNA na poziom białka FOXO i RFT;

- Wyniki demonstrujące zmiany składu błony mitochondrialnej (kardiolipiny) towarzyszące redukcji poziomu białka P53 w komórkach jelita;
- Implikacje morfologicznych zmian mitochondriów powiązanych z „brakiem” białka P53, z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej

Prezentacji oryginalnych i bardzo ciekawych rezultatów towarzyszą zwykle pytania i komentarze, co też niniejszym czynię.

Pierwsza uwaga dotyczy stosowanych w pracy standardowych warunków ”hodowli” linii komórkowych. Standardowe media pozbawione są z reguły witaminy C. Jeżeli takie były warunki hodowli to informacja zawarta w streszczeniu pracy „wykorzystany układ eksperymentalny nie zawierał zewnętrznych źródeł indukujących stres oksydacyjny” jest dyskusyjny. Witamina C jest znaczącym antyoksydantem. Komórki człowieka nie syntetyzują tego związku, w związku z tym brak tej witaminy w hodowli może, pośrednio, wpływać na indukcję stresu oksydacyjnego.

Wydaje się, że nie do końca wyjaśnionym dylematem rozprawy jest stwierdzony eksperymentalnie spadek poziomu anionorodnika nadadtlenkowego i równoczesny wzrost zawartości RFT. Wpisując się w schemat pracy, a dokładniej w merytoryczną zawartość rozdziału „Hipoteza” chciałbym zaproponować rozważenie jeszcze jednej, zdaje sobie sprawę dyskusyjną, hipotezę proponującą wyjaśnienie w/w dylematu. Oryginalnymi rezultatami recenzowanej rozprawy są stwierdzone zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej i zawartości kardiolipiny w błonie mitochondrialnej. Integralnym składnikiem mitochondriów i łańcucha fosforylacji są centra Fe-S, które spontanicznie reagują na zmiany oksydo-redukcyjne uwalniając jony Fe. We wstępie Autorka opisuje dwie podstawowe reakcje z udziałem Fe i anionorodnika; reakcje Fentona i Habera-Weisa, prowadzące do powstania rodnika $\text{OH}^\cdot$. Intensyfikacja tych reakcji indukowana stresem oksydacyjnym może prowadzić do zużywania się (i spadku poziomu) anionorodnika z jednoczesnym wzrostem poziomu RFT.

Słabą stroną rozprawy jest analiza 8-oksydG, bo taka jest poprawna nazwa (proszę sprawdzić w literaturze). W komercyjnych testach, takich jak Elisa wykorzystywane są mało specyficzne przeciwciała, które nie pozwalają na precyzyjną analizę 8-oksydG. Przeliczając wartości zilustrowane na Ryc. 16 na powszechnie przyjęte jednostki (ilość 8-oksydG/10⁶ zasad) otrzymamy liczbę ca 30 dla komórek HCT116 i RKO neo. Jest to wartość zdecydowanie za wysoka od tej przyjętej jako „norma” przez Europejską Komisję Standaryzacji Oksydacyjnie indukowanych uszkodzeń DNA (ESCODD).

Powyższe uwagi/komentarze sprowokowane oryginalnymi i ciekawymi rezultatami i równie ciekawą ich interpretacją, mają charakter dyskusyjny/polemiczny i niczym nie umniejszają mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Poterały – Hejmo. W moim przekonaniu obrona pracy będzie dobrym miejscem na wymianę poglądów/dyskusję dotyczącą moich komentarzy.

Rozprawa jest napisana bardzo starannie pod względem edytorskim, a wszystkie jej części świadczą o dużej wiedzy Autorki i Jej dojrzałości naukowej, co nieczęsto się zdarza na tym etapie rozwoju. Uważam, że rozprawa, jest oryginalnym osiągnięciem naukowym, wnoszącym nowe dane do wiedzy o biologii nowotworów i odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. Dlatego też chciałbym złożyć wyrazy uznania nie tylko dla Doktorantki, ale i dla Promotorki pracy.

Uwzględniając wartość poznawczą rozprawy, wykazaną w pracy bardzo dobrą znajomość problematyki badań, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im M. Skłodowskiej-Curie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Aleksandry Poterały – Hejmo do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Bydgoszcz 21.01.2020