

Bydgoszcz 2 listopada 2015 roku

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Katedra Onkologii, Radioterapii i Ginekologii Onkologicznej
Klinika Onkologii, Radioterapii i Ginekologii Onkologicznej
ul. dr I. Romanowskiej 2, 85-796 Bydgoszcz
tel./fax 52 374 33 94, 52 374 38 74
e-mail: kikgoipg@cm.umk.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Tomasza Adamusa, p.t. "Wpływ osi HGF-MET na aktywację procesu EMT w progresji przerzutowej raka szyjki macicy", promotor prof. Marcin Majka.

Rozprawa została przygotowana w Zakładzie Transplantologii Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, którą kieruje prof. dr hab. Maciej Siedlar. Jednostka zajmuje wysoka pozycję w rankingach naukowych w kraju. Przedstawiona rozprawa, przygotowana w tej jednostce cechuje się wysokim poziomem naukowym. Jest to rozprawa bardzo obszerna, w której doktorant przedstawił wyniki wielu eksperymentów, będących kontynuacją oryginalnych prac wybitnego naukowca, doświadczonego promotora, profesora Marcina Majki. Wiele z przedstawionych eksperymentów badawczych doktorant powtórzył co najmniej dwukrotnie, by uwiarygodnić wyniki. Należy podkreślić wkład pracy badawczej doktoranta w powstanie tej rozprawy. Rozprawa jest oryginalnym badaniem naukowym. Nie tylko zawiera wysokiej jakości badania molekularne, ale doktorant zasugerował interpretację kliniczną, co pomaga w znalezieniu klinicznego zastosowania wyników tych badań. Projekt badawczy wspomaga oryginalny model badawczy komórek raka szyjki macicy uwzględniający stopień ich klinicznego zaawansowania. Trudno jest teoretycznie w warunkach laboratoryjnych stworzyć model badawczy, który będzie odpowiadał danemu stanowi klinicznemu. Pracę doktoranta w tym zakresie należy docenić. Doktorant zaproponował przeprowadzenie eksperymentu badawczego niejako w dwóch zbiorach tkanek. W komórkach linii C-4I, które mają z założenia reprezentować nowotwór w stadium przedinwazyjnym, a komórki HTB-35

odpowiadają fenotypowo stadium jego inwazji. Ten model badawczy uwzględniający stopień zaawansowania klinicznego, przynajmniej w teoretycznym modelu jest niezwykle cenny i zbliża autora do wniosków, które mogą znaleźć zastosowanie kliniczne. Podjęte zagadnienie badawcze jest oryginalne i wpisuje się w światowy trend w badaniach molekularnych nad przerzutowaniem. Ta cecha fenotypowa nowotworu złośliwego jest niezwykle ważna gdy uwzględni się rozwój ognisk nowotworowego w danym miejscu organizmu. Początkowo proces lokalny, w wyniku stworzenia warunków do przerzutowania przechodzi w fazę choroby rozsianej. Badania nad podstawami molekularnymi tego zjawiska, co trafnie przez doktorant została zogniskowane na badaniu przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT) jest kluczowe dla wzbogacenia terapii przeciwnowotworowej o leki wpływające nie tylko na proliferację danej komórki. Nadal podstawą terapii przeciwnowotworowej jest przede wszystkim leczenie hamujące proliferację, czyli leczenie cytotoksyczne. Indywidualizacja terapii, czy też terapia skrojona na miarę nie zmieniła tego aż tak znacznie, jak sobie początkowo wyobrażano. Niezależnie czy to jest radioterapia, chemioterapia czy też leczenie chirurgiczne, podstawowa siła terapii przeciwnowotworowej to jej toksyczność. Doktorant wskazuje na możliwości jakie kryją się w ingerencji w proces stanowiący ważny element karcynogenezy, proces dzięki któremu komórka dynamicznie zmienia fenotyp. Dla powodzenia terapii przeciwnowotworowej nie jest konieczne uszkodzenie tej komórki tylko, zatrzymanie danego procesu. Takie rozumowanie doktoranta w czasie tworzeni hipotezy zerowej tej rozprawy wskazuje na znaczną wiedzę teoretyczną i praktyczną, ale także na zdolność wykorzystania jej poszczególnych elementów i stworzenie nowego modelu, lub rozwój nowego kierunku. Innowacyjność jest ważną cechą tej rozprawy. Doktorant właściwie dobrał badane białka i geny, których ocena w założonym modelu badawczym uwzględniającym stopień inwazji raka szyjki macicy, pozwoliła wnioskować o mechanizmach procesu biologicznego, którego rozwikłanie wpłynie zapewne na przebieg

leczenia raka szyjki macicy. Wybrano następujące białka: HGF, MET, Wnt i geny SLUG i SNAIL, oraz MMP-1 i MMP-9.

Wstęp do rozprawy to 25 stron zwartego tekstu. Ta sekcja ma typowy układ dla prac naukowych, zawierającego wszystkie informacje potrzebne do zrozumienia założeń badawczych doktoranta. Została ona napisana poprawnie. Dla lepszego przedstawienia tych wiadomości doktorant przygotował trzy barwne ryciny, które znacznie ułatwiają czytającemu zrozumienie i usprawniają czytanie. Podstawę teoretyczną wstępu i założeń badawczych tej pracy stanowi blisko osiemdziesiąt oryginalnych publikacji z ostatnich lat, w tym z roku 2015. Jest to więc nowe założenie badawcze wpisujące się w aktualne trendy. Jedynie jeden fragment zwrócił moją uwagę i wymaga pewnej interpretacji bądź zmiany przed ostateczną publikacją wyników:

„.....wczesne stadia nowotworowe są stosunkowo łatwo wyleczalne za pomocą konwencjonalnych terapii takich jak chemioterapia i lub radioterapia. W skrajnych przypadkach stosuje się leczenie skojarzone z zabiegiem chirurgicznym.....” (str. 9);

To zdanie jest niespójne i z punktu widzenia terapii raka szyjki macicy zawiera błędne tezy. Natomiast dla tej rozprawy nie jest ono kluczowe, lub jest nawet zbędne. Prawdopodobnie doktorant nie ma aż tak dużego doświadczenia klinicznego w leczeniu raka szyjki macicy, jak w przypadku przeprowadzania badań molekularnych i interpretacji ich wyników. Podobnie stwierdzenia „działalności rakotwórcza” (str.18); „progresja nowotworowa” (str.23), które powtarzają się we wstępie są z punktu widzenia leczenia raka szyjki macicy niezrozumiałe.

Cele pracy doktorant przedstawił jednoznacznie: „Celem niniejszej pracy było poznanie roli jaką pełni aktywacja receptora MET w procesie EMT raka szyjki macicy”. Wyszczególniono cztery cele szczegółowe, realizacja których jest wystarczająca do wyciągnięcia wniosków.

Kolejna sekcja materiał i metody to 11 stron tekstu. Została ona podzielona na podsekcje i wyodrębniono dodatkowo podpunkty. Zawiera ona pięć zbiorczych tabel. Jest to poprawnie napisana sekcja, jej układ jest typowy dla prac naukowych. Zostały w niej zawarte wszystkie niezbędne informacje. Jedyna uwaga ma charakter kliniczny, tak jak do wstępu. Na str. 28. doktorant opisał charakterystykę komórek. Komórki C-4I odpowiadają stopniowi I rozwoju nowotworu, zaś komórki HTB-35 stopniowi II. W dalszej części tekstu doktorant charakteryzuje je jako fenotyp odpowiednio przedinwazyjny i inwazyjny. Taki został założony model badawczy. „.....HTB35 fenotyp inwazyjny” (str. 41); „.....Wraz ze zmianą fenotypu nabywają zdolności do rozpraszania się i zdolności do migracji.....” (str. 46). Doktorant nie zaznaczył jednak jaką klasyfikację zastosował do oceny stopnia zaawansowania. Zapewne miał na myśli stosowaną najczęściej klasyfikację FIGO. Prawdopodobnie to odrębność ginekologii onkologicznej, gdyż zwykle stosuje się klasyfikację TMN, jest powodem pewnych nieścisłości. W stopniu I i II znajdują się pacjentki z inwazją, lecz różny jest zakres inwazji. Tę nieścisłość należy poprawić przygotowując ostatecznie materiał do druku. W tej sekcji doktorant wyczerpująco opisał stosowane techniki badawcze: izolację poszczególnych frakcji białkowych (cytoplazmatycznej i jądrowej), izolację RNA, RT PCR, cytometrię przepływową, immunofluorescencję, transfekcję komórek HTB35 cząstkami siRNA. Przedstawiony został także sposób przeprowadzenia analizy statystycznej. Ta sekcja zawiera wyczerpujące informacje i została napisana poprawnie. Lista zastosowanych technik badawczych, wymagających dużego doświadczenia jest imponująca.

Kolejna sekcja wyniki to 23 strony tekstu mającego typowy dla prac naukowych układ. Doktorant za pomocą 34 rycin, wiele z nich podwójnych zawierających wykresy i zdjęcia, jasno przedstawił otrzymane wyniki.

Doktorant zaobserwował:

- zastosowanie inhibitora zapobiega zmianom morfologicznym i całkowicie hamuje efekt rozpraszania komórek. Wskazał, że oś HGF/MET jest w pełni odpowiedzialna za zmiany fenotypowe komórek C-4I.
- zablokowanie aktywności szlaku MAPK jest wystarczające to zahamowania efektu rozpraszania komórek C-4I pod wpływem czynnika wzrostu HGF w obecności surowicy FBS.
- wpływ czynnika wzrostu HGF oraz Wnt-5a na zmiany morfologiczne w komórkach C-4I.
- synergiczne działanie czynnika HGF oraz Wnt-5a, wywiera on efekt słabszy niż HGF wraz z surowicą FBS.
- spadek ekspresji genu *SNAIL* o ponad 80%, a genu *SLUG* o blisko 95% w stosunku do kontroli;
- w wyniku stymulacji komórek czynnikiem wzrostu HGF w obecności surowicy FBS, 5-krotnie wzrasta ekspresja genu *MMP-1* i ok. 3-krotnie genu *MMP-9*;
- efektem stymulacji komórek C-4I czynnikiem wzrostu HGF w obecności surowicy FBS jest ok. 3-krotny wzrost ekspresji markera fenotypu mezenchymalnego – *VIM*;
- pod wpływem czynnika wzrostu HGF w obecności surowicy FBS formowane są lamellipodia i filopodia w komórkach C-4I;
- jednocześnie, komórki C-4I poddane działaniu HGF w obecności FBS wykazują 2-krotnie wyższą szybkość ruchu w stosunku do komórek kontrolnych.

Kolejna sekcja to dyskusja. Zawiera ona omówienie wyników w świetle doniesień innych autorów. Została napisana w odniesieniu do informacji z blisko 107 publikacji. Jest to sekcja napisana bardzo dobrze. Potwierdza duże odczytanie doktoranta.

Rozprawę kończy 9 wniosków. Najważniejszy z nich: „Oś HGF/MET jest w pełni odpowiedzialna za nabywanie inwazyjnych właściwości przez komórki RSM”. Wszystkie wnioski znajdują uzasadnienie w wynikach i w pełni odpowiadają na postawione cele rozprawy.

Rozprawa zgodnie z wymogami stawianymi przed tego typu pracami naukowymi zawiera także streszczenie języku polskim i angielskim.

Rozprawa pt. ” Wpływ osi HGF-MET na aktywację procesu EMT w progresji przerzutowej raka szyjki macicy”, spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych. Doktorant, mgr inż. Tomasz Adamus dowiódł swej dojrzałości naukowej. Rozprawa jest pracą wyróżniającą się i nowatorską. Godny uwagi jest logiczny, precyzyjny opis i przedstawienie problemu, jak i wyników. Na szczególne podkreślenie zasługują elementy poznawcze wynikające z pracy, mogące mieć znaczenie dla praktyki klinicznej.

W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego UJ CM w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Tomasza Adamusa do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę także o przyznanie wyróżnienia.

KIEROWNIK
Katedry Onkologii, Radioterapii
i Ginekologii Onkologicznej



prof. dr hab. Łukasz Wicherek