



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
ZAKŁAD BIOLOGII KOMÓRKI
KIEROWNIK ZAKŁADU
PROF. DR HAB. ZBIGNIEW MADEJA

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Dratkiewicz pt. „Inhibitory EGFR i c-Met jako czynniki ograniczające powstawanie inwadopodiów w komórkach ludzkiego czerniaka”

Nowotwory złośliwe należą niewątpliwie do najbardziej niebezpiecznych chorób z jakimi przychodzi się zmierzyć współczesnej medycynie. Choć postępy w walce z tą chorobą w ostatnich dziesięcioleciach są niewątpliwe, jednak medycyna jest daleka od całkowitego rozwiązania tego problemu. Klasyczne metody leczenia oparte na tradycyjnej chemioterapii w wielu przypadkach nie przynoszą oczekiwanych skutków. Z tego względu wielkie nadzieje wiąże się z szeregiem terapii celowanych opartych na zrozumieniu molekularnych dysfunkcji konkretnego nowotworu u konkretnego pacjenta. Terapie takie wymagają wielu badań z zakresu biologii komórki nowotworowej i ponadto są niezwykle kosztowne. Dodatkowym utrudnieniem jest to, że komórki nowotworowe nieustannie ewoluują nabywając nowe właściwości, dzięki którym stają się odporne na poszczególne terapie. Stąd wszelkie badania możliwości stosowania terapii łączonych polegających na równoczesnym podawaniu różnych inhibitorów szlaków przekazywania sygnałów istotnych dla rozwoju danego typu nowotworu są niezwykle interesującymi tematami badawczymi, których podjęcie wydaje się jak najbardziej uzasadnione.

Nic więc dziwnego, że również badania hamowania tak ważnych w regulacji proliferacji i migracji komórek szlaków sygnalizacyjnych jak szlak biegnący od aktywowanego receptora EGF i HGF budzą duże zainteresowanie. Ponieważ dodatkowo najbardziej niebezpieczną klinicznie cechą nowotworów jest ich zdolność do tworzenia przerzutów, możliwość hamowania tej aktywności komórek nowotworowych wydaje się być niezwykle atrakcyjna.

Głównym celem pracy doktorskiej Pani mgr Eweliny Dratkiewicz była weryfikacja hipotezy zakładającej, że EGFR i receptor c-Met mogą stanowić potencjalne cele molekularne w zindywidualizowanej terapii ukierunkowanej na hamowanie tworzenia

przerzutów przez komórki czerniaka. Przyjęty model badawczy zakładał badanie wpływu inhibitorów EGFR i c-Met na różnorodne formy aktywności komórek czerniaka ważne dla ich aktywności inwazyjnej.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Patologii Komórki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem Pani Prof. Doroty Nowak. Praca została zatem przygotowana w Zespole który od wielu lat zajmuje się badaniem mechanizmów tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe.

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 159 stron. W tekście zamieszczono 63 ryciny, 19 tabel i cytowano 243 pozycje literaturowe. Rozprawa doktorska Pani Eweliny Dratkiewicz ma typowy dla tego typu opracowań układ. W 30 stronicowym bogato ilustrowanym „Wstępie” autorka przedstawiła starannie przygotowany zestaw informacji ułatwiający czytelnikowi zrozumienie całości pracy. Wstęp doktorantka rozpoczyna od podania podstawowych informacji dotyczących epidemiologii i leczenia czerniaka a następnie omawia znaczenie receptorów EGF i c-Met w komórkach nowotworowych. W kolejnej części wstępu Autorka opisuje znaczenie aktywnej migracji komórek nowotworowych w procesie tworzenia przerzutów, ze szczególnym podkreśleniem roli podosomów. Ostatnia część wstępu poświęcona jest terapiom celowanym w zwalczaniu nowotworów oraz mechanizmom nabywania lekooporności i znaczenia w tym kontekście terapii łączonych.

Wstęp napisany jest przejrzysto i dobrze wprowadza czytelnika do zagadnień będących przedmiotem pracy doktorskiej. Warta podkreślenia jest również strona językowa tekstu, który czyta się bardzo dobrze. Autorka nie ustrzegła się jednak kilku nieścisłości. Trudno się zgodzić z twierdzeniem, że GTP-aza RAS fosforyluje kinazę RAF (str. 18). Nie wydaje mi się również, że ruch ameboidalny można sprowadzić tylko do tzw. mechanizmu blebującego (str 25). To jest tylko jedna z możliwości. Również wykorzystywanie siły mechanicznej do pokonywania bariery włókien macierzy zewnątrzkomórkowej jest raczej charakterystyczne dla migracji mezenchymalnej a nie ameboidalnej (str. 25). Poza tymi drobnymi uwagami wydaje mi się jednak, że wstęp jest napisany wyjątkowo dobrze i prowadzi czytelnika do jasno sprecyzowanego celu pracy.

W rozdziale „Materiały i metody” autorka zawiera wyczerpujące informacje dotyczące stosowanych metod eksperymentalnych oraz wykorzystanego materiału

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII UJ

biologicznego. W swoich badaniach doktorantka wykorzystała szereg metod zarówno biochemicznych jak i biologicznych, które są bez wątpienia właściwe do rozwiązania problemu będącego przedmiotem rozprawy doktorskiej. Opis stosowanych metod jest jasny i dokładny, stwarzający możliwość powtórzenia opisywanych doświadczeń. Prosiłbym jedynie o doprecyzowanie czy w metodzie pomiaru migracji spontanicznej (str. 66) pod pojęciem „dystans” należy rozumieć całkowitą drogę przebytą przez komórkę czy odległość pomiędzy pierwszym i ostatnim punktem trajektorii ruchu?

W rozdziale „Wyniki” autorka przedstawiła główne osiągnięcia swoich badań. Najważniejsze obserwacje poczynione przez Autorkę to:

1/ stwierdzenie, że łączone podawanie inhibitorów c-Met (foretinibu) oraz EGFR (gefitinibu lub lapatinibu) wydajnie obniżało aktywność metastatyczną badanych linii komórek czerniaka poprzez synergistyczny efekt cytotoksyczny, zahamowanie szlaków sygnałnych regulowanych przez receptor EGFR i c-Met, zahamowanie migracji i inwazji, ograniczenie tworzenia inwadopodiów oraz obniżenie aktywności proteolitycznej komórek czerniaka.

2/ zweryfikowanie roli receptorów EGFR i c-Met w indukowaniu tworzenia przerzutów przez komórki czerniaka poprzez wykazanie, że komórki czerniaka o podniesionym poziomie EGFR wykazywały zwiększoną aktywność migracyjną i inwazyjną a komórki o eksperymentalnie obniżonym poziomie receptorów EGFR i c-Met charakteryzowały się zmniejszoną aktywnością inwazyjną i proteolityczną.

3/ stwierdzenie, że komórki czerniaka wykazujące oporność na vemurafenib będący inhibitorem BRAF V600E, wykazywały podwyższony poziom EGFR i c-Met, zwiększoną aktywność inwazyjną i proteolityczną a właściwości te były skutecznie hamowane przez jednoczesne podawanie inhibitorów EGFR i c-Met.

Reasumując, Autorka otrzymała interesujące i spójne wyniki jednoznacznie wskazujące, że stosowanie duetu leków skierowanych przeciwko receptorom EGFR i c-Met wykazuje efekt synergistyczny i w związku z tym można się spodziewać skutecznego efektu terapeutycznego tych inhibitorów podawanych jednocześnie.

Lektura wyników prezentowanych w ocenianej pracy była bardzo interesująca i nasunęła również wiele pytań:

1/ Jakie wnioski wypływają z wyników prezentowanych na Ryc. 5.1? Trudno chyba na ich podstawie wnioskować, że ekspresja EGFR i c-Met jest kluczowa w uzyskiwanie przez komórki czerniaka właściwości metastatycznych.

2/ Dlaczego wg. Autorki linia WM239 reagowała na inhibitory EGFR, jeśli te komórki nie wykazują ekspresji tego receptora (Ryc. 5.2)?

3/ Jak można wytłumaczyć, że dla linii WM9 większy odsetek komórek apoptotycznych występował po zastosowaniu samego foretinibu niż mieszaniny leków?

4/ Dlaczego w testach zdolności inwazyjnej komórek czerniaka jak chemoatraktant stosowano jednocześnie 20% FBS, EGF i HGF? A nie jedynie badane czynniki wzrostowe, co wydawałoby się lepszym modelem w kontekście prowadzonych badań.

5/ Z jakiego powodu na wykresach trajektorii ruchu i aktywności ruchowej komórek podawano wyniki w jednostkach arbitralnych a nie w mikrometrach? To znacząco utrudnia ocenę rzeczywistej ruchliwości badanych komórek.

6/ Nie do końca jest jasne stwierdzenie (str. 93): *„Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego zostały następnie poddane analizie, podczas której zliczono wyłącznie punkty wykazujące współlokalizację sygnałów pochodzących od F-aktyny i kortaktyny (kolor żółty w nałożeniu) (Ryc. 5.18B)”*

Czy pod pojęciem punkty Autorka rozumie pojedyncze piksele czy w jakiś inny sposób zdefiniowane obszary odpowiadające inwadopodią? Powodem niejasności jest fakt, że na Ryc 18B na osi 0Y przedstawiona jest liczba inwadopodiów/jądro komórkowe.

7/ Jaki może być mechanizm tego, że komórki izolowane od pacjentów leczonych za pomocą radioterapii wykazywały wyjątkowe oporność na badane inhibitory? Czy może zawsze były to komórki od pacjentów leczonych zarówno chemio- jak i radioterapią?

Przedstawione powyżej, pytania wskazują, że przedstawione wyniki nie tylko odpowiadają na wiele istotnych pytań ale również stanowią podwaliny pod kontynuację tej tematyki badawczej

W 16 stronicowym rozdziale „Dyskusja” autorka krytycznie i ostrożnie ocenia własne wyniki na tle danych literaturowych. Rozprawę kończy bardzo czytelny rozdział „Wnioski”, w którym przedstawiono główne osiągnięcia badawcze i konkluzje płynące z przeprowadzonych badań.

Oceniana rozprawa doktorska została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. W całym tekście można znaleźć jedynie nieliczne uchybienia tej natury.

Przedstawione tutaj uwagi w żadnym stopniu nie wpływają na jak najbardziej pozytywną ocenę całej pracy doktorskiej. Wręcz przeciwnie, świadczą o tym, że prace czyta się z dużym zainteresowaniem a otrzymane wyniki są zachętą do stawiania wielu nowych pytań. Pani Ewelina Dratkiewicz jest ponadto współautorką 7 prac eksperymentalnych opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach. Prace te były już 15 razy cytowane w literaturze światowej. Na uwagę zasługują również fakt, że wyniki pracy doktorskiej zostały już opublikowane w 4 pracach eksperymentalnych w takich czasopismach jak: *International Journal of Molecular Sciences*, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *Frontiers in Pharmacology*, *Oncotarget*.

Podsumowując, zarówno dorobek naukowy jak i rozprawę doktorską Pani mgr Eweliny Dratkiewicz oceniam bardzo wysoko. W moim przekonaniu autorka uzyskała wartościowe, stanowiące nowość naukową wyniki, które otwierają szerokie perspektywy badawcze na przyszłość. Przedstawiona do oceny praca spełnia wszelkie wymogi rozprawy doktorskiej. Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Dratkiewicz przez Radę Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie stopnia doktora nauk biologicznych. Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o rozważenie możliwości wyróżnienia ocenianej pracy.


(Zbigniew Madeja)