

Prof. dr hab. Jacek Bigda  
Zakład Biologii Komórki  
Katedra Biotechnologii Medycznej  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed  
Gdański Uniwersytet Medyczny

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Beaty Talar  
pt. „**Molekularne mechanizmy działania pentoksyfiliny w komórkach  
czerniaka**”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Czyż

Czerniak jest jednym z najbardziej złośliwych nowotworów ludzkich. Stale notuje się rosnącą zapadalność na ten nowotwór, związaną najprawdopodobniej ze zwiększoną ekspozycją na promieniowanie UV. Pomimo ostatnich postępów w terapii czerniaka, dostępne powszechnie leczenie jest tylko rzadko skuteczne. Dlatego uzasadnione jest poszukiwanie nowych substancji terapeutycznych stosowanych samodzielnie czy w skojarzeniu z dostępnymi dotychczas lekami. W ten nurt wpisuje się przedłożona do oceny rozprawa poświęcona analizie mechanizmu działania pentoksyfiliny wobec komórek czerniaka. Doktorantka analizowała w szczególności potencjalny wpływ pentoksyfiliny na regulację podstawowego, kanonicznego szlaku WNT w komórkach pierwotnych hodowli czerniaka uzyskanych od pacjentów. Postawiona hipoteza była uzasadniona zarówno przesłankami literaturowymi, w tym obserwacjami poczynionymi we wcześniejszych publikowanych pracach zespołu kierowanego przez prof. Czyż.

W przedłożonej rozprawie realizowanej m. in. w ramach projektu NCN Autorka planowała określić: 1/ efekty komórkowe (w tym cytotoksyczność, zahamowanie proliferacji) pentoksyfiliny wobec pięciu hodowli komórek czerniaka, 2/ aktywność kanonicznego szlaku WNT w badanych 5 populacjach komórkowych, ew. wpływ pentoksyfiliny na aktywność białek tego WNT szlaku oraz genów kodujących te białka i genów docelowych, a także 3/ ew. wpływ pentoksyfiliny na ekspresję i aktywność czynnika transkrypcyjnego istotnego dla funkcji melanocytów – MITF-M.

Postawione cele pracy były uzasadnione i dawały szansę dostarczenia istotnych nowych informacji wyjaśniających działanie pentoksyfiliny na komórki badanych hodowli czerniaka.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń Autorka opisała aktywność kanonicznego szlaku WNT w badanych populacjach komórek czerniaka. Wykazała zróżnicowanie badanych populacji identyfikując grupę dwóch hodowli wolno proliferujących o wysokim poziomie jądrowej beta-kateniny, wysokiej aktywności czynników transkrypcyjnych TCF/LEF oraz zwiększonej ekspresji regulowanych przez nie genów – MITF-M i CTGF. Pozostałe trzy populacje komórek czerniaka uzyskane od kolejnych trzech pacjentów zaklasyfikowała jako szybko proliferujące o wysokiej ekspresji i sekrecji DKK1, inhibitora kanonicznego szlaku WNT. Doktorantka stwierdziła, że pentoksyfilina działała silniej wobec komórek wolno proliferujących, wywołując efekt cytostatyczny poprzez zatrzymanie cyklu w fazie G0/G1 oraz cytotoksyczny poprzez indukcję apoptozy. Obniżenie aktywności kanonicznego szlaku WNT poprzez pentoksyfilinę Autorka obserwowała w komórkach wolno proliferujących, odznaczających się wysoką aktywnością szlaku. Efekt ten był wyrażony zwiększeniem ekspresji inhibitora DKK1, obniżeniem poziomu jądrowej beta-kateniny i obniżeniem aktywności czynników transkrypcyjnych TCF/LEF. W konsekwencji obserwowała również niższą ekspresję genów docelowych, w tym kodujących białka szlaku WNT oraz czynnik transkrypcyjny MITF-M.

Należy zatem wskazać, że Doktorantka zrealizowała wszystkie cele postawione w pracy, bowiem zidentyfikowała anty-proliferacyjne działanie pentoksyfiliny wobec komórek czerniaka, opisała regulacyjny wpływ tej substancji na aktywację kanonicznego szlaku WNT oraz jego genów docelowych, a tym MITF-M.

Wnioski odpowiadają celom postawionym w pracy i znajdują pełne uzasadnienie w wynikach przedstawionych w rozprawie. Należy podkreślić, że opisany przez Doktorantkę hamujący wpływ pentoksyfiliny na kanoniczny szlak WNT nie był dotychczas opisywany. Stanowi istotne oryginalne doniesienie, które zostało opisane w publikacji zespołu prof. Czyż (PLoS One, 2016), w której Doktorantka jest pierwszym autorem.

Dokumentacja pracy zawarta jest na 110 stronach maszynopisu w typowym układzie zawierającym 13 rycin, wyodrębniony spis skrótów, wniosków, streszczenie

w języku polskim i angielskim oraz spis aktualnych pozycji bibliograficznych. Układ pracy jest przejrzysty, język poprawny i zrozumiały, z niemal pomijalną liczbą błędów edytorskich. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo dobra znajomość obszaru badawczego, udokumentowana zarówno bardzo dobrze skonstruowanym wstępem teoretycznym rozprawy, jak i swobodną, kompetentną dyskusją. Doktorantka posłużyła się również nowoczesnymi metodami biologii molekularnej i biologii komórki, wykazując tym samym dużą biegłość techniczną.

Do pracy wkraśli się drobne i nieliczne niedociągnięcia: 1/ zabrakło szczegółowego opisu jak wiele pasażów poszczególnych hodowli było wykonywanych w trakcie doświadczeń; 2/ częste dość w pracach zapomnienie, że Bradford nie była mężczyzną; 3/ niezbyt szczęśliwe cytowanie literatury przeglądowej w sytuacjach, gdy warto odnosić się do prac oryginalnych np. na stronie 78 w odniesieniu do stosowania immunoterapii czerniaka. Ponadto, w toku dyskusji w ramach publicznej rozprawy niewątpliwie ciekawe, przynajmniej dla niżej podpisanego, będą: 1/ spekulacja nt. mechanizmu powstania różnorodności w stanie aktywacji kanonicznego szlaku WNT w badanych populacjach komórek czerniaka, a także 2/ dyskusja nt. uzasadnienia potencjalnego klinicznego stosowania pentoksyfiliny w świetle uzyskanych wyników dotyczących hamowania ścieżki WNT i jednoczesnej zwiększonej obecności receptora FZD7, które może być zaangażowany w progresję nowotworu.

W podsumowaniu recenzji pragnę stwierdzić, że - obok nowych informacji o działaniu pentoksyfiliny na komórki czerniaka oraz jej wpływu na funkcjonowanie kanonicznego szlaku WNT - Doktorantka udokumentowała bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu, umiejętność wykorzystania nowoczesnych technik badawczych oraz zdolność do interpretacji złożonych wyników. Wykazała tym samym umiejętność samodzielnej pracy badawczej. W związku z powyższym pragnę przedstawić opinię, że rozprawa odpowiada warunkom określonym w stosownych zapisach ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych. Dlatego wnoszę o dopuszczenie mgr Beatę Talar do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na wysoką wartość naukową rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie.

Gdańsk, dnia 2 października 2016 roku

prof. dr hab. Jacek Bigda 