



Dr hab. Magdalena Jaszek prof. UMCS
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie- Skłodowskiej
W Lublinie

Recenzja

Rozprawy doktorskiej Lek. Karola Rogowskiego

p.t. „ Ocena modulacyjnego działania tamoksyfenu na ekspresję i funkcję sparowanych immunoreceptorów kwasu sjałowego Siglec-5/14 w komórkowym modelu raka piersi”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska przygotowana przez Lek. Karola Rogowskiego dotyczy ważnej tematyki badawczej bardzo dobrze wpisującej się w potrzeby naukowe współczesnej medycyny. Doktorant ocenił w modelu *in vitro* modulacyjne działanie tamoksyfenu na ekspresję i funkcję sparowanych immunoreceptorów kwasu sjałowego Siglec-5/14 w komórkowym modelu raka piersi”.

Problemy związane z odpowiedzią komórek organizmu na pojawiające się zmiany patologiczne takie jak nowotwory, które destabilizują jego naturalną homeostazę oraz poszukiwanie jak najbardziej efektywnych metod ich leczenia stanowią jeden z wiodących nurtów współczesnej farmakologii. Prowadzone są liczne badania dotyczące zarówno poznania mechanizmów molekularnych działania znanych leków takich jak tamoksyfen jak i wprowadzenia nowych czynników o potencjalnym działaniu terapeutycznym. Należy podkreślić, że rak piersi jest ogromnym wyzwaniem dla współczesnej medycyny ponieważ jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych u kobiet dającym przerzuty zarówno do węzłów chłonnych jak i narządów wewnętrznych. W chwili obecnej badania genetyczne i proteomiczne komórek nowotworowych stają się standardem stosowanym przy podejmowaniu decyzji o konkretnym postępowaniu farmakologicznym. Jednym z ważnych elementów tych badań są np. sjałowane glikany błon komórkowych oraz ich oddziaływanie ze swoistymi immunoreceptorami z rodziny Siglec mogące prowadzić do hamowania lub aktywacji układu immunologicznego pacjenta, procesów kluczowych w przebiegu progresji nowotworu. Jak wskazują dostępne dane literaturowe receptory te stanowią ważny element badań dotyczących nowotworzenia a zwłaszcza raka piersi. w tym kontekście wyniki stanowiące treść przedstawionej do oceny Rozprawy Doktorskiej dotyczące konkretnie sparowanych immunoreceptorów kwasu sjałowego Siglec-5/14 nabierają szczególnego znaczenia. Kompleksowe poznanie zagadnień związanych z modulacją ich ekspresji i roli przez

znane leki takie jak zaproponowany w pracy tamoksyfen dostarcza nowych danych na temat tego związku stosowanego w leczeniu raka piersi i tym samym może mieć wpływ na skuteczność planowanej terapii. Dlatego w opinii recenzenta podjęcie przez Doktoranta zaprezentowanej tematyki badań jest jak najbardziej uzasadnione.

Rozprawa doktorska przygotowana przez Lek. Karola Rogowskiego ma układ klasyczny charakterystyczny dla prac eksperymentalnych. Opracowany manuskrypt obejmuje 134 strony tekstu, 24 strony spisu 260 pozycji piśmiennictwa oraz 4 tabele i 43 ryciny w których zaprezentowano wyniki eksperymentów stanowiących podstawę merytoryczną pracy. Praca została podzielona przez Doktoranta na 9 rozdziałów, poprzedzona spisem treści oraz skrótów wykorzystanych w przedstawionym do oceny manuskrypcie i zakończona spisem literatury. Spis skrótów został przygotowany przejrzyście i starannie. Manuskrypt jest opracowany z zachowaniem reguł dotyczących rozpraw doktorskich.

Wstęp pracy został podzielony przez Doktoranta na siedem podrozdziałów. W pierwszym Autor opierając się na przeglądzie dostępnych danych literaturowych wprowadza czytelnika w tematykę obejmującą epidemiologię i czynniki ryzyka związane z etiopatogenezą raka piersi. Opisuje zarówno czynniki niemodyfikowalne o podłożu genetycznym czy zależne od płci pacjentki jak i modyfikowalne wynikające z prowadzonego stylu życia czy działania układu hormonalnego. W kolejnym podrozdziale Autor skupił się na omówieniu metod diagnostycznych służących wykryciu guza i jego prawidłowemu rozpoznaniu przy wykorzystaniu technik takich jak mammografia piersi będąca badaniem podstawowym, badanie ultrasonograficzne piersi, obrazowanie za pomocą rezonansu magnetycznego (MRI) czy umożliwiające ostateczne rozpoznanie raka piersi badanie histopatologiczne tkanki guza. W tym podrozdziale wspomniano również o badaniach genetycznych jako testach wykrywających dziedziczne predyspozycje do zachorowania na ten typ nowotworu. Podrozdział czwarty wstępu został poświęcony przedstawieniu kryteriów szczegółowej klasyfikacji raka piersi. Umożliwia ona ocenę rokowań, agresywności czy przeżywalności u danej pacjentki i opiera się na wielu kryteriach, wśród których najważniejsze to typ histologiczny, zaawansowanie kliniczne nowotworu, status receptorowy komórki nowotworowej czy klasyfikacja DNA. Do zilustrowania przedstawionych danych Doktorant wykorzystał sporządzone w oparciu o dostępne dane literaturowe rycinę i tabele. w odczuciu recenzenta należałoby zwrócić większą uwagę na ich jakość i przejrzystość np. dodać tytuły poszczególnych kolumn. Jest to warte rozważenia zwłaszcza w kontekście przyszłej publikacji. Podrozdział 5 koncentruje się wokół tematyki metod stosowanych w leczeniu nowotworów piersi. Zwrócono w nim uwagę na fakt, że nadal główną procedurą jest leczenie chirurgiczne oszczędzające pierś lub mastektomia z całkowitym lub częściowym usunięciem piersi w której zdiagnozowano obecność zmiany nowotworowej. Opisana została również radioterapia, i leczenie systemowe ze stosowaną chemioterapią, immunoterapią czy hormonoterapią. Podpunkt poświęcony hormonoterapii został podzielony na dwie oddzielne części poświęcone w pierwszej kolejności inhibitorom aromatazy a następnie selektywnym modulatorom receptora estrogenowego (SERM). W podpunkcie tym Autor opisuje rolę tamoksyfenu w terapii raka piersi. Ze względu na znaczenie tego elementu w prezentowanej Rozprawie Doktorskiej korzystne byłoby w odczuciu recenzenta przedstawienie charakterystyki tamoksyfenu w postaci np. tabeli i ewentualnie schematu ilustrującego mechanizm jego

działania i wyraźne oddzielenie informacji dotyczących tego leku od innych zawartych w tej części wstępu. Zebranie informacji o innych lekach z tej grupy wraz ze wskazaniem różnic w ich budowie i mechanizmach działania w postaci np. oryginalnego diagramu lub oddzielnej tabeli mogłoby poprawić przejrzystość tego podrozdziału. Kolejny podpunkt **Wstępu** wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z terapią celowaną stosowaną w leczeniu raka piersi. Jako cel leków z tej grupy są wymieniane białka powierzchniowe i cytoplazmatyczne charakterystyczne dla komórek nowotworowych. Ich ekspresja jest szacowana w ramach profilowania molekularnego danego pacjenta i jest różnicą pomiędzy komórką nowotworową a prawidłową. Znaczna część rozdziału **Wstęp** została poświęcona przez Autora wprowadzeniu czytelnika w tematykę związaną z rolą układu odpornościowego w przebiegu procesów kancerogenezy. Na podstawie odpowiednio dobranych danych literaturowych scharakteryzowane zostały antygeny nowotworowe, odpowiedź immunologiczna organizmu podczas kancerogenezy w tym rola komórek NK, makrofagów, neutrofilii, komórek dendrytycznych czy limfocytów T. Ostatni podrozdział pierwszej części Rozprawy Doktorskiej został poświęcony szczegółowemu opisaniu receptorów Siglec. Zaproponowany przez Autora schemat prezentacji danych opartych na aktualnym stanie wiedzy dobrze wprowadza czytelnika w zaproponowany w pracy temat badawczy. Znajdujemy w nim opis podstaw teoretycznych definicji i nazewnictwa, podziału receptorów Siglec oraz ich dystrybucji w konkretnych typach komórek. W podrozdziale 1.7.2 zamieszczono dane dotyczące podziału, miejsca występowania opisywanych receptorów oraz ich udziału w procesach chorobowych. Dowiadujemy się m.in., że spośród 17 dotychczas opisanych receptorów Siglec aż 15 zostało zidentyfikowanych w organizmie człowieka. Usystematyzowanie i przedstawienie danych w postaci tabeli dobrze wprowadza czytelnika w temat pracy. w odczuciu recenzenta można na potrzeby przyszłych publikacji przemyśleć i dopracować opis poszczególnych kolumn, które są nieco zbyt ogólne i skrótowe. Pojawiły się w tym fragmencie również pewne błędy edytorskie- np. ostatni wiersz tabeli znalazł się na kolejnej stronie manuskryptu. Dalsze podrozdziały Autor poświęcił przedstawieniu ekspresji opisywanych receptorów oraz podstaw molekularnych przekazywania przez te integralne białka błonowe sygnałów wewnątrzkomórkowych. W tym fragmencie pojawiło się zdanie „Fosfatazy SHP-1 i SHP-2 defosforylują pośrednie sygnały wewnątrzkomórkowe, prowadząc do zakończenia sygnału aktywującego generowanego przez cytozolowy receptor ITAM”, które zdaniem Recenzenta jest niejasno sformułowane- defosforylacja sygnałów wydaje się być tutaj dosyć niefortunnym określeniem. W podrozdziale 1.7.5 opisano rodzinę kwasów sjałowych skupiająca niemal pięćdziesiąt monocukrów pochodnych kwasu neuraminowego. Dominującymi w błonach komórkowych i płynach ustrojowych ssaków są trzy główne związki takie jak kwas N-acetylo-5-neuraminowy (kwas sjałowy, Neu5Ac), kwas N-glikoliloneuraminowy (Neu5Gc) oraz 5-acetylo-9-O-acetyloneuraminowy (Neu5,9Ac2). Autor wyjaśnia w tym podrozdziale oraz dwóch następnych znaczenie kwasu sjałowego i wzoru sjałilacji błon komórkowych w mechanizmach odpowiedzi immunologicznej oraz procesach nowotworzenia. Pewną nieścisłością w odczuciu recenzenta jest używanie w opisie kwasu sjałowego sformułowania „ekspresja kwasu sjałowego” czy „ekspresja sjałotransferaz” w pojęciu biochemicznym określenie „ekspresja” jest raczej zarezerwowane dla opisywania ekspresji genów, dla białek- biosynteza . Uwaga ta odnosi się ogólnie do całej pracy. w przypadku podrozdziału 1.7.5 korzystne byłoby zdaniem recenzenta przedstawienie części informacji w formie np. tabeli. Podrozdział 1.7.8. zawiera

aktualne dane dotyczące sparowanych immunoreceptorów Siglec-5 i Siglec-14 stanowiące dobre uzasadnienie podstaw wyboru tematu badawczego prezentowanej Rozprawy Doktorskiej. Opisywane receptory Siglec-5 i Siglec-14 to ludzkie receptory Siglec spokrewnione z CD33 obecne na powierzchni np. komórek szpiku, neutrofilach, monocytach, komórkach dendrytycznych, w makrofagach tkankowych. w Siglec-5 (sygnalizacja hamująca) zidentyfikowano 4 domeny zewnątrzkomórkowe Ig- podobne i cytozolowe motywy sygnalizacyjne ITIM aktywujące fosfatazy tyrozynowe SHP-1 i SHP-2. Receptor Siglec-14 będący białkiem transbłonowym, złożonym z trzech domen Ig-podobnych, domeny transbłonowej i fragmentu cytoplazmatycznego. Co charakterystyczne część cytoplazmatyczna Siglec-14 nie zawiera motywów sygnalizacyjnych ITIM (sygnalizacja aktywująca). Pewien niedosyt budzi czytelność wykorzystanych w tym rozdziale opracowań graficznych dotyczących opisywanego tematu zwłaszcza Rycina 6. i 10. Zabrakło też w odczuciu recenzenta podania danych literaturowych prac wykorzystanych przez Doktoranta przy wykonaniu Ryciny 11. Korzystne byłoby również wyraźne podkreślenie nowatorskiego charakteru opisanych w pracy eksperymentów w odniesieniu do dostępnych danych literaturowych.

Podsumowując, poza pewnymi niedociągnięciami edytorsko- stylistycznymi, rozdział **Wstęp** przedstawionej do recenzji Rozprawy Doktorskiej opracowano w sposób obszerny, bardzo dobrze wprowadzający czytelnika w temat pracy, a zamieszczone informacje zostały poparte odpowiednio dobranymi danymi literaturowymi. Odzwierciedla on również dobrze przemyślane podejście Autora do opisywanych zagadnień.

Kolejnym rozdziałem jest **Cel pracy** w którym Doktorant w syntetyczny sposób przedstawił główne założenia zrealizowanego planu eksperymentalnego. Według opisu jego wykonanie miało doprowadzić do określenia cytotoksycznego wpływu tamoksyfenu na komórki raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231 oraz monocytów linii THP-1 (monokultury lub kokultury) oraz ocenę wpływu tamoksyfenu na aktywność immunologiczną monocytów linii THP-1(monokultury THP-1 lub kokultury z komórkami MCF-7 i MDA-MB-231). Doktorant zaplanował także m.in. zbadanie działania tamoksyfenu na ekspresję receptorów Siglec-5 i Siglec-14 w monocytach linii THP-1 (monokultury lub kokultury z MCF-7 i MDA-MB-231) oraz interakcje sparowanych receptorów Siglec-5 i Siglec-14 z błonami komórek raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231 (monokultury MCF-7 i MDA-MB-231 lub kokultury hodowane z THP-1).

Kolejny rozdział to **Materiały i Metody**. Wykorzystana w pracy metodyka eksperymentalna, świadczy o dobrym opanowaniu przez Doktoranta nowoczesnego warsztatu badawczego odpowiednio dobranego do zadań przedstawionych w celu pracy. Rozdział ten złożony jest z 4 podrozdziałów obejmujących spis wykorzystanych materiałów, aparatury i zastosowanego oprogramowania. Zamieszczono także szczegółowy opis wykorzystanych linii komórkowych poparty dokumentacją fotograficzną wykonaną osobiście przez Doktoranta i opis hodowli zarówno w warunkach monokultury jak i kokultury. Z punktu widzenia recenzenta korzystne byłoby uzupełnienie fotografii o skalę. Scharakteryzowane zostały szczegółowo procedury przygotowania materiału biologicznego wykorzystanego do wykonanych oznaczeń takich jak: ocena wpływu tamoksyfenu na żywotność komórek MCF-7 i MDA-MB-231 i monocytów linii THP-1 w warunkach monokultury i kokultury (test MTT)

(zastosowano stężenia od 0,1 do 50 μM), ocena potencjału inwazyjnego komórek nowotworowych (test migracji), ocena wpływu tamoksyfenu na aktywność immunologiczną komórek THP-1 oparta na analizie profilu uwalnianych z nich wybranych cytokin pro- i przeciwzapalnych (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 i TNF α) w monokulturze i kokulturach oraz markerów różnicowania się monocytów THP-1 i fenotypu immunologicznego (CD68 i arginazy-1). W kolejnych podrozdziałach rozdziału 3.3. Doktorant zamieścił metodykę badawczą wykorzystaną do detekcji wpływu tamoksyfenu na ekspresję sparowanych receptorów Siglec-5/14 i elementów wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych (cytometryczny pomiar ekspresji sparowanych receptorów Siglec-5/14 na powierzchni komórek THP-1 w warunkach monokultury i kokultury, reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (Real Time PCR) do wykazania zmian w poziomie ekspresji genów (SIGLEC5, SIGLEC14, SHP1 (PTPN6), SHP2 (PTPN11), DAP12 (TYROBP)). Jako ostatni etap opisana została przez Autora metodyka zastosowana do oceny wiązania białek fuzyjnych Siglec-5 Fc i Siglec-14 Fc do wykorzystanych jako materiał biologiczny komórek nowotworowych MCF-7 i MDA-MB-231.

Kolejny rozdział pracy to **Wyniki**, które Doktorant podzielił na 8 podrozdziałów opisujących kolejno realizację planu badawczego przedstawionego w **Celu** pracy. Rozdział ten został opracowany przez Autora w sposób analityczny i przejrzysty. Badania, które stały się podstawą prezentowanej pracy wykazały, że w przypadku linii MCF-7 tamoksyfen w stężeniach 10 i 50 μM spowodował istotny statystycznie spadek żywotności komórek nowotworowych tak w warunkach monokultury jak i kokultury z komórkami THP-1. w przypadku komórek linii MDA-MB-231 zaobserwowano efekt podobny lecz różnice nie były istotne statystycznie. Badanie wpływu tamoksyfenu na żywotność komórek linii THP-1 pokazało, że w tym przypadku jedynie przy 50 μM tamoksyfenu zaobserwowano istotny statystycznie efekt hamujący. Wyniki kolejnego etapu badań przedstawione przez Doktoranta posłużyły do oceny potencjału migracyjnego komórek raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231 w warunkach monokultury lub w kokulturze z monocytami linii THP-1. Jak wynika z zamieszczonego opisu, dodatek 10 μM tamoksyfenu zarówno w przypadku komórek linii MCF-7 jak i MDA-MB-231 tak w monokulturach jak i kokulturach z monocytami linii THP-1 spowodował wyraźne ograniczenie ich potencjału migracyjnego w porównaniu do próbek bez dodatku leku. Zgodnie z opisem zamieszczonym w dyskusji potencjał migracyjny badanych linii nowotworowych był wyższy w obecności monocytów linii THP-1. Jeżeli chodzi o interpretację końcową przedstawionych wyników, z punktu widzenia recenzenta wskazana byłaby weryfikacja tekstu opisującego wyniki z opisem zastosowanej metodyki badawczej. Pojawiają się tu jednak pewne nieścisłości, które warto byłoby ujednolicić i wyjaśnić: a) jaki parametr był podstawą przeprowadzonej analizy czy był to rozmiar szczeliny (szerokość szczeliny), pole powierzchni szczeliny czy odległość pomiędzy czołami komórek- na wykresie mamy np. kolejny parametr względną szerokość szczeliny a w podpisie pole powierzchni szczeliny, b) czy nie byłoby wskazane przyjęcie jako kontroli hodowli bez tamoksyfenu z 24h i porównanie jej z kulturami po inkubacji z tamoksyfenem co prawdopodobnie najlepiej odzwierciedlałoby różnice wywołane działaniem leku. Warto byłoby również zweryfikować opisy dotyczące zależności wynikających ze zmian pola powierzchni szczeliny a zwiększenia lub zmniejszenia potencjału migracyjnego komórek: im mniejsze pole powierzchni szczeliny, rozmiar szczeliny czy względna szerokość szczeliny w odniesieniu do kontroli tym większa

migracja komórek. W opisie wyników tego badania pojawił się także prawdopodobnie błąd edytorski w zdaniu „ Pomiar powierzchni wolnej od komórek wykazał, że w monokulturach komórek linii MCF-7 i ich kokulturach z monocytami linii THP-1 pole powierzchni szczeliny zmniejszyło się znamienne odpowiednio o 68% i 52% w ciągu 24 godzin od wykonania „rany” - zamiast linii MCF-7 powinna być zapewne wymieniona linia MDA-MB-231, której dotyczą przedstawione na figurze 22 i 23 wyniki. Powyższe uwagi mogą w opinii recenzenta pomóc zwłaszcza przy opracowaniu danych do ewentualnej przyszłej publikacji uzyskanych wyników.

W kolejnym podrozdziale **Wyników** zaprezentowano zmiany w poziomie wybranych cytokin TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 i IL-12p70, określające immunomodulacyjne działanie tamoksyfenu w zastosowanych w pracy układach doświadczalnych (w monokulturach monocytów linii THP-1 i kokulturach z komórkami raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231). Porównując poziomy wymienionych cytokin wykazano różnice pomiędzy komórkami w kulturach z dodatkiem tamoksyfenu w odniesieniu do kontroli. Niższe poziomy TNF- α , IL-6 i IL-8 zaobserwowano w hodowlach monocytów THP-1 w monokulturze odniesieniu do stężeń w próbkach uzyskanych z kokultur. w monokulturach monocytów THP-1, nie stwierdzono wydzielania IL-1 β , IL-10 i IL-12p70. Przedstawione dane wskazują na wyraźnie prozapalny charakter działania tamoksyfenu potwierdzony wzrostem stężenia TNF α we wszystkich wariantach badawczych. W odniesieniu do zaprezentowanych danych zdaniem recenzenta dobrze byłoby uwzględnić w wykorzystanym modelu biologicznym np. przy okazji powtórzenia oznaczeń dotyczących IL-10 i IL-12p70 również monokultury komórek raka piersi linii MCF-7 i MDA-MB-231 aby zbadać czy obserwowana reakcja nie jest również wynikiem specyficznych oddziaływań międzykomórkowych. Wyniki przedstawione w pracy wskazują, że zarówno w przypadku monokultury monocytów linii THP-1 jak i ich kokultur z komórkami MCF-7 i MDA-MB-231 obecność tamoksyfenu zwiększała ekspresję CD68 oraz obniżała poziom arginazy-1, jednak w tym przypadku mimo obserwowanego efektu hamującego w kokulturach THP-1 z komórkami MDA-MB-231 różnice nie były istotne statystycznie. W przypadku analizowanej ekspresji sparowanych receptorów Siglet 5/14 statystycznie istotny efekt stymulujący tamoksyfenu zanotowano jedynie w przypadku kokultur THP-1 z komórkami MCF-7. Inkubacja z tamoksyfenem również w istotny sposób zwiększała ekspresję genów SIGLEC5 i SIGLEC14 zarówno w monokulturach THP-1 jak i kokulturach. Określany w pracy jako poziom transkryptów genu SIGLEC14 był wyraźnie wyższy od SIGLEC5. Odnośnie genu PTPN6 poziom transkryptów wzrastał jedynie po dodaniu tamoksyfenu do monokultur THP-1. W kokulturach z komórkami MDA-MB-231 ekspresja była wyraźnie hamowana. Odmienny wynik uzyskano badając poziom ekspresji genów PTPN11 i TYROBP, gdzie zanotowano wzrost poziomu transkryptów zarówno w monokulturach THP-1 jak i kokulturach z komórkami linii MDA-MB-231. W tej części wyników dobrze byłoby doprecyzować jednostki podawane na figurach: relatywna ekspresja genu , względna ekspresja. Wyniki badań dotyczące działania tamoksyfenu w kontekście wiązania rekombinowanego białka fuzyjnego Siglec-5/Fc z komórkami linii MCF-7 i MDA-MB-231 wykazała istotny statystycznie wzrost powinowactwa w przypadku monokultur MCF-7 i kokultur z THP-1 oraz kokultur MDA-MB-231z monocytami THP-1. Dla białka Siglec-14/Fc taki efekt zanotowano w monokulturach MDA-MB-231 i kokulturach MDA-MB-231 z monocytami THP-1.

Podsumowując rozdział **Wyniki**, pomimo uwag dotyczących przedstawienia tej części pracy, z których część ma charakter dyskusyjny stanowi on kompleksowe i syntetyczne opracowanie. Ten fragment rozprawy został przygotowany w sposób staranny i przejrzysty.

Otrzymane w wyniku realizacji planu badawczego wyniki zostały podsumowane w liczącym 12 stron rozdziale **Dyskusja**, gdzie Doktorant przedstawił interpretację uzyskanych w pracy danych w oparciu o zaproponowany materiał literaturowy. Rozdział ten zawiera obszernie fragmenty opisujące problemy związane z leczeniem raka piersi, znaczeniem profilowania i katalogowania mikrośrodowiska nowotworu piersi na poziomie komórkowym, poznaniem złożonych mechanizmów leżących u podstaw kontroli immunologicznej, dynamiką przerzutowania, jego wrażliwością na chemioterapię czy immunoterapię. Doktorant przedstawił też kryteria wyboru konkretnych linii komórek nowotworowych oparte na ich cechach biologicznych np. ekspresja receptorów estrogenowych czy poziom wrażliwość na tamoksyfen.

Doktorant na podstawie wybranych danych literaturowych wyjaśnił rolę i zasadność wyboru badania poziomu ekspresji białka CD68 i arginazy-1 jako wskaźników fenotypu M1 i M2. Uzasadnił i przedyskutował również w oparciu o trafnie dobrane dane wybrany model badania immunomodulacyjnego wpływu tamoksyfenu poprzez ocenę ekspresji konkretnych cytokin. Uzyskane rezultaty pozwoliły na sformułowanie wniosku potwierdzającego prozapalne działanie badanego leku. Z zaprezentowanych danych dotyczących zmian poszczególnych markerów wynika, że tamoksyfen zwiększa również ekspresję sparowanych receptorów Siglec-5/14 i wiązanie białek fuzyjnych w wybranych układach doświadczalnych wykorzystanych w pracy. Sposób zaprezentowania tego rozdziału wyraźnie pokazuje, że Autor jest dobrze zorientowany w opisywanej problematyce naukowej, potrafi prawidłowo analizować wyniki wykonanych analiz oraz w sposób przejrzysty je przedstawić w kontekście aktualnych danych literaturowych. W odczuciu recenzenta przygotowując pracę do publikacji warto ograniczyć nieco część teoretyczną na rzecz interpretacji danych doświadczalnych. Korzystne byłoby również w opinii recenzenta włączenie do tego rozdziału schematycznych opracowań graficznych podsumowujące omawiane dane. Według oceny recenzenta o czym wspomniano wcześniej może wyraźniej należałoby bardziej podkreślić również w tym miejscu nowatorskie elementy pracy, dotyczące modulacyjnego działania tamoksyfenu w kontekście ekspresji i funkcji sparowanych immunoreceptorów Siglec-5/14 w badanym modelu raka piersi.

Oceniany manuskrypt zakończony został przez Doktoranta rozdziałem zatytułowanym **Wnioski**, który jest raczej syntetycznym podsumowaniem najważniejszych wyników uzyskanych podczas realizacji zadań zaproponowanych w celu pracy. Główne osiągnięcia przedstawione przez Lek. Karola Rogowskiego koncentrowały się wokół kilku punktów takich jak: a) hamowanie przez tamoksyfen w zastosowanym stężeniu wzrostu i potencjału migracyjnego komórek raka piersi linii MCF-7 (estrogenozależnych) hodowanych zarówno w warunkach monokultury jak i kokultury z komórkami THP-1, b) potwierdzenie efektu immunomodulacyjnego tamoksyfenu w badanym układzie doświadczalnym (zmiana profilu wykrytych cytokin i polaryzacja fenotypu monocytów linii THP-1 w obecności komórek MCF-7 i MDA-MB-231), c) stymulacja ekspresji sparowanych receptorów Siglec-5/14 w monocytach THP-1 w kokulturach z komórkami MCF-7 lub MDA-MB-231, d) zmiana w poziomie transkrypcji genów SIGLEC5, SIGLEC14, PTPN6, PTPN11 i DAP12

w monocytach linii THP-1 w wykorzystanych modelach badawczych, e) prawdopodobna immunomodulacja mikrośrodowiska zmiany nowotworowej poprzez wpływ tamoksyfenu na ekspresję sparowanych receptorów Siglec-5/14 w monocytach i ich powinowactwo do komórek nowotworowych MCF-7 oraz MDA-MB-231. Warto zaznaczyć, że rozdział ten odpowiada schematowi zadań badawczych zawartych w celu pracy.

Podsumowując, w mojej ocenie wykonana i przedstawiona do recenzji przez Lek. Karola Rogowskiego Rozprawa Doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie zaproponowanego w celu pracy, konkretnego zadania badawczego i może być podstawą do przyszłych publikacji naukowych. Biorąc pod uwagę wzrastający odsetek chorych na raka piersi precyzyjna diagnostyka, ocena rokowań i podjęcie optymalnego postępowania terapeutycznego nabiera szczególnego znaczenia. Bardzo ważne są tutaj wysiłki podejmowane w kierunku nie tylko analizy genomu czy proteomu komórek nowotworowych ale również badania mikrośrodowiska guza związane z rozrostem nowotworu. W procesach tych ważną rolę odgrywiają sjalowane glikany błony komórkowej, które poprzez immunoreceptory z rodziny Siglec mogą modulować odpowiedź immunologiczną. Podwyższone w próbkach z tamoksyfenem wiązanie białek fuzyjnych Siglec-5 i Siglec-14 do wykorzystanych w pracy komórek nowotworowych sugeruje również możliwość zmiany wzoru sjalilacji błony komórkowej w zaproponowanych układach doświadczalnych. W opinii recenzenta wyniki przedstawione przez Doktoranta mogą zostać wykorzystane jako składowa nowoczesnych narzędzi diagnostycznych w przewidywaniu progresji nowotworu oraz ocenie wybranej procedury leczniczej również pod kątem oddziaływań międzykomórkowych w mikrośrodowisku guza.

Pracę oceniam pozytywnie podkreślając, że zamieszczone w recenzji uwagi, sugestie czy pytania nie zmieniają w żaden sposób jej ogólnej pozytywnej oceny. Przedstawiona do recenzji Rozprawa spełnia kryteria stawiane eksperymentalnym pracom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.). W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie Lek. Karola Rogowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 12.07.2023

Dr hab. Magdalena Jaszek prof. UMCS

