



## Uniwersytet Łódzki

### Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin

dr hab. prof. nadzw. UŁ Tomasz Sakowicz

Łódź, dnia 5.04.2016 r.

### O C E N A

pracy doktorskiej mgr Magdaleny Cybuli pt.:

**„*PODŁOŻE MOLEKULARNE ROZWOJU RAKA KRTANI NA PODSTAWIE ANALIZY  
EKSPRESJI WYBRANYCH GENÓW*”**

Nowotwory zaliczane są do grupy tzw. chorób cywilizacyjnych określanych też jako choroby XXI wieku, co jasno wskazuje, że są poważnym problemem współczesnych społeczeństw, szczególnie tych najbardziej rozwiniętych. Rak krtani, którego wybranym aspektem poświęcona jest praca doktorska p. Magdaleny Cybuli, również należy do tej kategorii. Jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych głowy i szyi, a ryzyko zachorowań w Polsce jest około 8-krotnie wyższe u mężczyzn niż u kobiet i rośnie z wiekiem. Najwyższe wskaźniki zachorowalności oraz umieralności osiągane są pomiędzy 45 a 70 rokiem życia. Zgony z powodu raka krtani stanowią 2-3% wszystkich zgonów w Polsce dla obu płci i wskaźnik ten jest niestety wyższy niż średnia dla krajów Unii Europejskiej. Wśród czynników ryzyka wystąpienia raka krtani na pierwszym miejscu pozostaje palenie tytoniu. Najczęstszym typem histologicznym nowotworu złośliwego krtani jest rak płaskonabłonkowy, który stanowi ponad 95% nowotworów krtani. U niemal 50% chorych stwierdza się przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych. Rokowanie u pacjentów z rakiem krtani jest ściśle związane z takimi parametrami jak: wielkość guza, jego lokalizacja, stopień złośliwości histologicznej, wieki pacjenta, a także podatność na przerzuty do regionalnych

węzłów chłonnych szyi. Molekularne podłoże rozwoju raka krtani jest stosunkowo słabo poznane, jednocześnie nie ma wątpliwości, że wiedza taka może znacząco przyczynić się do właściwego diagnozowania choroby i ograniczenia zachorowań. W tym kontekście, wybór tematyki pracy doktorskiej zaproponowany przez promotora prof. Janusza Szemraja i podjęty przez doktorantkę, uważam za bardzo trafny. Szczególnie podkreślić chcę skierowanie zainteresowania autorów na cząsteczki miRNA, których aktywność budzi nieprzerwane zainteresowanie badaczy jako cząsteczki zaangażowane w procesy regulacji ekspresji licznych onkogenów i genów supresorowych. Wiadomo, że pomiary poziomu ich ekspresji pozwalają diagnozować liczne nowotwory. Same miRNA mogą również działać jako onkogeny i supresory, a jednocześnie być zaangażowane w przerzuty nowotworów gdzie pełnią rolę aktywatorów lub inhibitorów procesu, co obserwowano m.in. w przypadkach białaczek, raku piersi, trzustki czy prostaty.

Praca doktorska mgr Magdaleny Cybuli ma typowy układ przyjęty dla tego typu opracowań. *Tytuł* pracy, po zapoznaniu się z jej zawartością, został wg mnie, sformułowany nieco zbyt „mocno”. Biorąc pod uwagę złożoność problematyki, analizie poddano jedynie wybrane elementy komórkowe związane z procesem nowotworzenia. Końcowe wyniki mogą przyczynić się do interesującego wzbogacenia aktualnej wiedzy na temat molekularnego podłoża raka krtani, ale w obecnej sytuacji uważam, że jedynie częściowo nawiązują do zaproponowanego tytułu. Na stronie tytułowej pracy dostrzegam ponadto błąd w tytule naukowym promotora.

Opracowanie rozpoczyna się od przedstawienia *Wykazu* stosowanych w nim skrótów. Wg mnie został on zdecydowanie za bardzo rozbudowany przez, liczy bowiem aż 7 stron co kontrastuje z 10-ciomą stronami rozdziału *Wyniki*, a jednak to ten drugi jest zasadniczą częścią pracy. Zachwiane więc zostały proporcje między poszczególnymi rozdziałami. Na zamieszczonej liście znalazły się skróty od dawna używane w specjalistycznej literaturze jak GTP, GDP, cAMP, PCR, 3'UTR, RT-PCR i kilka innych, stąd nie widzę większej potrzeby ich wyjaśniania, tym bardziej że tego rodzaju opracowanie zainteresuje raczej osoby, którym nieobce są wymienione skróty.

Kolejny rozdział pracy to *Wstęp* liczący 31 stron. Jak sugeruje nazwa, powinien wprowadzać czytelnika w zagadnienie, którego dotyczy praca. W tym przypadku tak jednak nie jest. Pierwszy punkt to miRNA, a dalej jego biogeneza. Ewidentnie brakuje choćby kilku zdań wyjaśniających powiązania między tymi hasłami, a problematyką pracy dotyczącą nowotworów i podłoża ich rozwoju. Wydaje się, że to jednak od omówienia nowotworów

głowy i szyi należałoby rozpocząć ten rozdział, a dopiero w dalszej części przejść do omówienia wspomnianych miRNA oraz genów strukturalnych wiązanych z nowotworami. Za mało precyzyjne uważam też tytuły kilku podrozdziałów *Wstępu* jak np. *Niektóre choroby i procesy fizjologiczne* (str. 19). Podrozdziały są jednak dobrze napisane, dodatkowo wzbogacone zostały w przejrzyste schematy, pomocne w odbiorze treści. Mogą stanowić dobrą bazę do napisania ciekawego artykułu poglądowego.

*Cele* pracy zostały jasno i precyzyjnie zdefiniowane w postaci trzech głównych zadań i ściśle korespondują z profilem zaplanowanych badań. Głównym celem pracy była analiza różnic w ekspresji wybranych genów zaangażowanych w proces nowotworowy raka krtani, w porównaniu z tkanką prawidłową. Ponadto autorka postanowiła podjąć próbę analizy korelacji pomiędzy ekspresją badanych genów, a stopniem zaawansowania klinicznego, stopniem zróżnicowania guza, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych oraz wiekiem i płcią pacjentów.

Praca jest stosunkowo uboga metodycznie, ale jednocześnie zastosowane techniki są jak najbardziej adekwatne dla tego rodzaju analiz, a co najważniejsze, uzyskane wyniki pozwoliły zrealizować postawione cele.

*Wyniki* to kolejny rozdział pracy, wg mnie potraktowany przez autorkę dosyć „oszczędnie”, zważywszy na miejsce jakie wcześniej poświęciła części teoretycznej pracy czy wspomnianemu już *Wykazowi skrótów*. Wyniki są podstawową częścią pracy i w głównej mierze decyduje o jej wartości. Już na wstępie rozdziału brakuje mi wyraźnej informacji o kryteriach jakimi kierowano się przy wyborze tych, a nie innych genów strukturalnych i miRNA w planowanych analizach. Co prawda, we *Wstępie* pojawia się sekcja 1.3. zatytułowana *Charakterystyka wybranych genów*, ale poza tym, że zostały tam dobrze opisane, brak informacji dlaczego wybrano właśnie te? Z procesami nowotworzeni związanych jest wiele innych genów biorących np. udział w regulacji podziałów komórkowych, procesów różnicowania czy hamujących apoptozę obok tych, którymi zajmowała się autorka. U człowieka zidentyfikowano do tej pory ponad 2500 cząsteczek miRNA i przypisuje się im udział w regulacji co najmniej 30% wszystkich genów, co podkreśla ich znaczenie m.in. w procesach nowotworzeni. W pracy zajęto się 5 miRNA, dlaczego właśnie tymi?, poproszę o parę zdań komentarza w tej kwestii. Co do samych wyników nie mam uwag krytycznych, są w mojej ocenie wartościowe, jasne przedstawione i dobrze zilustrowane za pomocą odpowiednich wykresów. Oczekiwałbym może mniej lakonicznego opisu tabel np. Tab. 18. *Prawdopodobieństwa klasyfikacji a posteriori dla*

*poszczególnych przypadków.* Wg mnie, pełniejszy opis ułatwiłby odbiór ich zawartości. Myślę, że przy opracowywaniu wyników pod kątem publikacji warto na ten element zwrócić uwagę. W tym miejscu, chciałbym prosić autorkę pracy o komentarz na temat specyfiki obserwowanych efektów ekspresji badanych genów na tle innych, niż rak krtani, nowotworów.

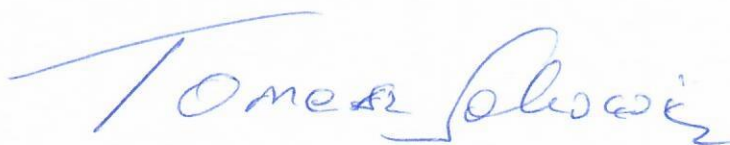
*Dyskusja* jest rozdziałem dobrze napisanym. Autorka w krytyczny sposób odnosi się do uzyskanych rezultatów na tle bogatej literatury poświęconej różnym postaciom nowotworów. Przy okazji widać też, jak duże jest na świecie zainteresowanie podjętą w pracy problematyką. Ogromna większość z cytowanych przez doktorantkę artykułów (130 pozycji) to publikacje nowe lub najnowsze z ostatnich kilku lat, zostały one przez autorkę właściwie dobrane i cytowane w stosownych miejscach.

O ile, jak napisałem wcześniej, cele pracy zostały, właściwie i precyzyjnie określone to rozdział *Wnioski*, który powinien ściśle korespondować z celami, jest wg mnie słabszą częścią opracowania, co może dziwić, zważywszy na wartościowe rezultaty jakie uzyskała doktorantka. Uważam, że mogły zostać staranniej opracowane i sformułowane, do czego uprawniały autorkę uzyskane rezultaty. W jednym z punktów czytamy np., że częstość zmian w poziomie ekspresji miR-21-3p i miR-525-5p jest podwyższona w raku krtani, ale analiza odpowiednich danych zamieszczonych na str. 59 wskazuje, że taki efekt obserwowano jedynie wśród 25% pacjentów poddanych badaniu (dla miR-21-3p) podczas gdy u 60% takich zmian nie obserwowano. Również dla drugiego z wymienionych mir-525-5p u większości z badanych nie stwierdzono nadekspresji tych cząsteczek. W tej sytuacji uważam, że należałoby nieco zweryfikować pierwotny wniosek. Proszę o skomentowanie tego wyniku. W dostarczonej do oceny pracy nie znalazłem informacji dotyczącej publikacji uzyskanych wyników, niemniej uważam, że są one bardzo wartościowe, a co za tym idzie, zasługują na opracowanie i przesłanie do pisma o stosownym profilu. Finalne wnioski, wg mnie, w umiarkowanym stopniu nawiązują do tytułu pracy, jako czytelnikowi nie łatwo jest jednoznacznie ocenić w jakiej mierze uzyskane rezultaty wyjaśniają podłoże molekularne rozwoju raka krtani.

Reasumując, mimo pewnych uwag krytycznych, pracę doktorską mgr Magdaleny Cybuli uważam za wartościowe opracowanie, wnoszące nowe informacje na temat zmian w ekspresji pewnej grupy genów związanych z procesem nowotworzenia. Podzielam też przekonanie doktorantki, że niektóre z tych genów mogą w przyszłości okazać się przydatne jako potencjalny marker molekularny m.in. na etapie identyfikacji komórek nowotworowych.

### **Wniosek końcowy**

Oceniana przeze mnie rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm). Biorąc pod uwagę wszystkie elementy ocenianej pracy, łącznie z jej koncepcją, z przekonaniem przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Cybuli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



**dr hab. prof. nadzw. UŁ Tomasz Sakowicz**