



Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Katedra Genetyki Molekularnej

dr hab. prof. nadzw. UŁ Tomasz Śliwiński

Łódź, dnia 3 marca 2016 r.

Katedra Genetyki Molekularnej

Uniwersytetu Łódzkiego

O c e n a

pracy doktorskiej mgr Magdaleny Cybuli

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

Rak krtani jest, z jednej strony, najczęściej występującym nowotworem regionów głowy i szyi, zaś z drugiej strony należy do grupy nowotworów złośliwych, które stanowią istotny problem współczesnej medycyny, będący przyczyną dużego odsetka śmiertelności w krajach wysoko rozwiniętych. Pomimo trwających od wielu lat badań skupiających się na wprowadzeniu nowych metod diagnostycznych oraz terapeutycznych dla tego nowotworu, odsetek pacjentów z remisją uległ niewielkiej poprawie. Wraz z pojawieniem się informacji na temat roli mikroRNA w nowotworzeniu, duże nadzieje wzbudza ich analiza ze względu na odmienny profil ekspresji tych czynników w różnych typach nowotworów. Dzięki temu możliwa będzie poprawniejsza i dokładniejsza klasyfikacja typów nowotworów, a dodatkowo w porównaniu do genów strukturalnych tj. genu kodującego podjednostkę regulatorową kinazy PI3K IA (*PIK3R1*), genu dla receptora 4 chemokiny z motywem CXC (*CXCR4*), genu kodującego receptor 4 z rodziny Frizzled (*FZD4*), genu kodującego ligazę ubikwitynową E3 z domeną HECT (*HACE1*) czy genu kodującego białko CRK należące do rodziny białek adaptorowych biorących udział w przekazywaniu sygnałów w komórce (*CRK*), mikroRNA mogą okazać się atrakcyjniejszym celem terapii przeciwnowotworowej.

Ze względu na ograniczoną wiedzę dotyczącą profilu molekularnego dla badanych genów strukturalnych oraz mikroRNA, w kontekście raka krtani, uważam za bardzo zasadne podjęcie badań zaprezentowanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej.

Oceniana rozprawa ma typowy układ dysertacji doktorskiej. W części poglądowej (30 stron) Doktorantka opisała kilka zagadnień pozostających w ścisłym związku z wykonywanym projektem badawczym. Wśród nich, po wprowadzeniu dotyczącym biogenezy mikroRNA oraz mechanizmu i obszaru ich działania, mgr Magdalena Cybula opisała rolę mikroRNA, w procesie nowotworzenia czy niektórych chorobach oraz procesach fizjologicznych. Następnie Doktorantka skupiła się na opisie nowotworów głowy i szyi, a na samym końcu dokonała charakterystyki wybranych genów strukturalnych zaangażowanych w proces transformacji nowotworowej. Część ta została poparta, bardzo dobrze dobranymi, 100 pozycjami literaturowymi, w większości pochodzącymi z ostatnich kilku lat. Kolejność opisywanych zagadnień powinna być wg. mnie nieco zmieniona i w adekwatniejszej chronologii, nawiązującej do tytułu pracy.

Głównym celem pracy była analiza różnic w ekspresji wybranych genów zaangażowanych w proces nowotworowy oraz mikroRNA w raku krtani, w porównaniu z tkanką prawidłową, jak również określenie korelacji pomiędzy ekspresją badanych czynników, a stopniem zaawansowania klinicznego, stopniem zróżnicowania guza, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych oraz wiekiem i płcią pacjentów.

Doktorantka zajęła się analizą ekspresji 5 genów strukturalnych zaangażowanych w proces nowotworowy: *PIK3RI*, *CXCR4*, *FZD4*, *HACE1*, *CRK* oraz 5 mikroRNA: miR-21-3p, miR-139-3p, miR-377-5p, miR-525-5p, miR-885-5p. Dodatkowo analizowano występowanie zależności pomiędzy ekspresją badanych genów, a cechami kliniczno-histopatologicznymi.

Podczas realizacji tych zadań mgr Magdalena Cybula opanowała i zastosowała metodę reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR). Materiał do badań stanowiła tkanka pobrana od 47 pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem krtani. Jako materiał kontrolny wykorzystano tkankę prawidłową pochodzącą od tego samego pacjenta. Na badania te została wydana zgoda właściwej Komisji Bioetyki UM w Łodzi.

Dobrze zaplanowany projekt badawczy i jego konsekwentna realizacja z wykorzystaniem właściwie dobranych metod, wnikliwa statystyczna ocena wyników oraz godna podkreślenia udana współpraca z Uniwersyteckim Szpitalem Klinicznym im. Norberta Barlickiego w Łodzi w zakresie pozyskiwania bogatego, zdiagnozowanego materiału klinicznego, zaowocowała uzyskaniem interesujących, oryginalnych ustaleń, m.in.

- Zmiany ekspresji mikroRNA w badanej populacji pacjentów z rakiem krtani występują częściej niż w przypadku analizowanych genów strukturalnych.
- Poziomy nici komplementarnych do nici wiodących: miR-21-3p i miR-139-3p, które badane są rzadziej, również wykazują zmiany ekspresji w raku krtani.
- Poziom ekspresji miR-21-3p i miR-525-5p jest podwyższony, podczas gdy ekspresja miR-139-3p i miR-885-5p, jak i *PIK3RI* jest obniżona w raku krtani w porównaniu do tkanki kontrolnej.

- Zmiany w ekspresji genu *PIK3RI* oraz miR-885-5p mogą być wykorzystane w klasyfikacji tkanki zmienionej nowotworowo oraz tkanki prawidłowej.

Wyniki badań własnych Doktorantka zilustrowała za pomocą przejrzystych, dobrze skonstruowanych 14 rycin i dobrze opisanych 18 tabel. Bardzo czytelny wykaz skrótów pozwala na łatwe zapoznanie z treścią zawartą w rozprawie.

Dyskusja jest napisana bardzo dojrzałe, a Doktorantka dokładnie analizuje uzyskane wyniki, na tle wyników podobnych badań wykonanych przez inne zespoły badawcze, oraz co bardzo istotne, wyjaśnia mechanizmy mogące leżeć u podstaw zaobserwowanych korelacji.

W pracy znalazły się nieliczne błędy edytorskie, co na tak dość obszerną rozprawę (88 str.) jest godne podkreślenia. W tym miejscu z obowiązku recenzenta przedstawiam uwagi dotyczące drobnych, nielicznych uchybień oraz własne sugestie:

- Jak już napisałem na początku recenzji inaczej powinny być rozłożone akcenty we wstępie rozprawy. Jako, że w tytule nie ma informacji o mikroRNA rozdział ten powinien zaczynać się od opisu nowotworów, w tym raka krtani, a następnie powinien się koncentrować na ich molekularnej etiopatogenezie, gdzie znalazłoby się również miejsce dla wspomnianych mikroRNA. Chronologia takiego wstępu korespondowała by wtedy bardziej z tytułem pracy.
- W przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej zabrakło mi charakterystyki materiału stanowiącego grupę kontrolną. W jaki sposób wykluczano, że dany typ tkanki nie posiada znamion transformacji nowotworowej i sklasyfikowaną ją jako prawidłową?
- Zabrakło mi jasnego wniosku odnoszącego się do celu nr 3 tj. korelacji pomiędzy ekspresją badanych genów, a stopniem zaawansowania klinicznego, co dziwi tym bardziej, iż taka korelacja została przedstawiona w rozdziale *Wyniki*. Takie podsumowanie jest dosyć istotne z punktu widzenia klinicznego i dlatego też prosiłbym Doktorantkę, aby odniosła się do tej uwagi podczas obrony doktoratu.
- Wyniki badań przedstawione w recenzowanej pracy doktorskiej należy uznać za oryginalne i istotne z punktu widzenia diagnostyki i prognostyki w raku krtani. Czy istnieje możliwość kontynuacji tych wartościowych badań w Zakładzie Biochemii Medycznej UM, poszerzonych o licznější pulę pacjentów w celu zwiększenia mocy statystycznej badań, co z kolei, w przypadku otrzymania istotnych korelacji, mogłoby w przyszłości pozwolić na zwiększenie grupy znanych już markerów dla tego typu schorzenia? A może istnieje szansa na prowadzenie dalej idących badań pozwalających na wykorzystanie badanego profilu ekspresji w kierunku personalizacji terapii przeciwnowotworowej?

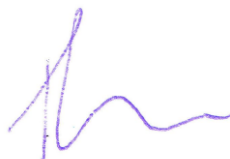
Kierownik zespołu badawczego, prof. dr. hab. n. med. Janusz Szemraj, jest uznanym naukowcem o renomie międzynarodowej, zajmującym się od wielu lat podłożem molekularnym nowotworzenia, spod jego ręki ukazało się wiele bardzo istotnych prac, jak również wypromował On kilku młodych perspektywicznych badaczy. W związku z tym myślę, że zapoczątkowane przez zespół Pana

Profesora, te bardzo istotne badania, powinny być kontynuowane, ze względu na to, że mogą przynieść wymierne efekty w postaci zrozumienia mechanizmu tej choroby, jak również proponowania nowych molekularnych markerów diagnostycznych czy prognostycznych raka krtani.

Te drobne uwagi mają charakter roboczy i nie zmieniają mojej wysokiej oceny niniejszej dysertacji. Jestem głęboko przekonany, że stanowi ona dobry przykład samodzielnego rozwiązania dobrze zaplanowanego projektu badawczego, mogącego przynieść wymierne efekty praktyczne, w postaci nowych markerów diagnostycznych czy prognostycznych, niezbędnych we właściwej ocenie ryzyka powstawania i progresji raka krtani.

Promotor dysertacji prof. dr. hab. n. med. Janusz Szemraj oraz Doktorantka są współtwórcami tej pracy, którą z pełnym przekonaniem można określić mianem sukcesu naukowego, zwłaszcza że uzyskane oryginalne wyniki są unikatowe w skali światowej. Potwierdzeniem mojej tezy jest to, że część wyników uzyskanych podczas realizacji pracy doktorskiej zostało opublikowane w dobrym czasopiśmie z listy JCR.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Uwzględniając koncepcje badawcze oraz warsztat praktyczny zastosowany w pracy, z przyjemnością przedkładam do Wysokiej Rady 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 Sliwiński