



**WYDZIAŁ BIOLOGII
I OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Dr hab. Michał Bijak, prof. WICHiR
Katedra Biochemii Ogólnej

Łódź, dnia 14.06.2019 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Weroniki Świtlik pt.: „Zmiany ekspresji genów
wybranych mikroRNA u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca”**

Promotor pracy – Prof. dr hab. n. med. Janusz Szemraj

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska składa się z cyklu publikacji złożonego z trzech prac naukowych, w tym dwóch prac eksperymentalnych w języku angielskim oraz jednej pracy przeglądowej przygotowanej w języku polskim. Wszystkie te prace zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR), a Doktorantka jest w nich pierwszym Autorem. Łączna punktacja prac włączonych w cykl stanowiący podstawę rozprawy doktorskiej stanowi 50 pkt. MNiSW (według ujednoliconego wykazu) oraz 4,353 pkt. współczynnika oddziaływań Impact Factor.

Rak płuca to jeden z najczęstszych i najgorzej rokujących nowotworów złośliwych. Ten typ raka jest to najczęściej występujący nowotwór złośliwy u mężczyzn i drugi pod względem występowania u kobiet. Każdego roku w Polsce odnotowuje się około 20 000 nowych przypadków tego nowotworu (w tym ok. 15 000 zachorowań u mężczyzn oraz ok. 5 000 u kobiet). Rak płuca jest główną przyczyną zgonu z powodu chorób nowotworowych w Polsce. Aż ok. 30% wszystkich zgonów mężczyzn z powodu chorób nowotworowych wiąże się z rakiem płuca. Występowanie raka płuca jest głównie skorelowane z narażeniem dróg oddechowych na substancje toksyczne: w tym dym tytoniowy (palenie czynne oraz bierne), radon, azbest, krzem, nikiel, chrom, arsen oraz zanieczyszczone powietrze (pyły PM 10 i PM 2,5). Rak płuca był rzadką chorobą jeszcze na początku XX wieku, jednakże wzrost ekspozycji

na czynnik toksycznej spowodował lawinowy wzrost zachorowalności w drugiej połowie XX oraz w XXI wieku. Dzięki temu rak płuc uzyskał miano choroby cywilizacyjnej.

Na raka płuc składa się kilkadziesiąt rodzajów nowotworów złośliwych o różnej patofizjologii. Mogą mieć one różną strukturę, lokalizację czy odmienne rokowanie. Jeżeli chodzi o podział histopatologiczny nowotworu płuc, wyróżnia się dwa główne typy: drobnokomórkowego raka płuc, który stanowi obecnie 15–20% wszystkich nowotworów nabłonkowych płuca oraz niedrobnokomórkowego raka płuc (NDRP), który stanowi aż 80% wszystkich rozpoznawanych przypadków. Wskaźnik 5-letnich przeżyć dla tego typu nowotworu jest niski i wynosi około 10%, stąd też olbrzymie znaczenie ma diagnostyka tego nowotworu i jego wczesne wykrycie, które pozwala na uzasadnione leczenie chirurgiczne.

Pierwsze objawy raka płuc pojawiają się dosyć późno, co znacznie utrudnia procedurę leczniczą oraz daje gorsze rokowania dla pacjenta. Główne objawy kliniczne raka płuc to przewlekły kaszel lub krwioplucie. Objawem raka płuc może być też ból w klatce piersiowej (ból opłucnowy), duszność lub zakażenie dróg oddechowych. Jednak objawy te oprócz tego, że pojawiają się już w późnym stadium choroby są także często bagatelizowane, ze względu na brak ich specyficzności. Znalezienie wysoce czułych, molekularnych biomarkerów raka płuc może przyczynić się do wcześniejszego wykrycia, a co za tym idzie zwiększenia się wskaźnika 5-letnich przeżyć. Stąd też wiele badań we wiodących ośrodkach naukowych na świecie jest skupionych na znalezieniu nowatorskich biomarkerów wykrywających chorobę we wczesnym jej stadium. Temat rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Świtlik idealnie wpisuje się w te poszukiwania. Doktorantka skupia swoją uwagę na cząsteczkach mikroRNA, które wydają się być przyszłością diagnostyki molekularnej chorób człowieka, w tym chorób nowotworowych.

MikroRNA (miRNA) są klasą małych, niekodujących cząsteczek RNA zawierających od 21 do 24 nukleotydów, które w warunkach prawidłowych działają jako ujemne regulatory ekspresji docelowego mRNA na poziomie potranskrypcyjnym. Dojrzałe cząsteczki mikroRNA zachowują się jak potranskrypcyjne regulatory ekspresji genów dzięki parowaniu zasad z cząsteczkami mRNA. Cząsteczki miRNA hybrydują z kompleksem indukującym wyciszanie RNA (RISC) w regionie 3'-UTR. Regulacja genu przez kompleks RISC odbywa się na drodze połączenia pomiędzy regionem w miRNA (2-7 oraz 8 nukleotydem) a regionem 3'-UTR w mRNA. Istnieje coraz więcej dowodów sugerujących kluczową rolę miRNA w wielu procesach biologicznych takich jak: wzrost komórek, różnicowanie tkankowe, proliferacja komórek, rozwój zarodkowy czy apoptoza. Cząsteczki miRNA odgrywają bardzo ważną rolę również w przekazywaniu komórkowym. Mutacje miRNA, dysfunkcje czy

zaburzenia regulacji miRNA mogą wpływać na rozwój różnych chorób. Aktualnie, znane jest ponad 70 chorób, które są związane z cząsteczkami mikroRNA.

Praktyczne wykorzystania cząsteczek miRNA do nieinwazyjnego wykrywania nowotworów, zwłaszcza w ich wczesnym stadium rozwoju, jest dużym wyzwaniem, jednak badania prowadzone w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie wskazują właśnie te cząsteczki jako przełom w molekularnej diagnostyce raka. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę w ramach przedstawionej dysertacji wpisują się w ten nurt naukowy, co ze względu na możliwość praktycznego zastosowania zasługuje na szczególną pochwałę.

Za cel główny realizowanych badań Doktorantka postawiła sobie zbadanie wybranych cząsteczek miRNA (dokładnie sześć typów tych cząsteczek: miR-21-5p, miR30a-5p, miR-126-3p, miR-205-5p, miR-210-3p oraz miR-486-5p) w materiale biologicznym pobranym od chorych ze zdiagnozowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca oraz określenie czy cząsteczki te mają potencjalne zastosowanie jako biomarkery diagnostyczne. Cel ten został rozbity na pięć celów szczegółowy, które zostały osiągnięte przez Doktorantkę w trakcie realizacji swoich badań.

We wprowadzeniu pracy Doktorantka uzasadnia dlaczego wybrała te 6 cząsteczek miRNA, jednak moim zdaniem tak strategiczny wybór powinien być szerzej uzasadniony oraz skonfrontowany z informacją na temat wcześniejszych badań prowadzonych nad wykorzystaniem tych miRNA jako biomarkerów NDRP. Oczywiście nie podważa to w żaden sposób dokonanego przez Doktorantkę wyboru oraz badań, które przeprowadziła, natomiast precyzyjne wyjaśnienie podjęcia tematu badawczego uważam za ważny element każdego badania naukowych.

Badania przeprowadzone były na 50 pacjentach pochodzących ze Specjalistycznego Szpitala Gruźlicy, Chorób Płuc i Rehabilitacji w Tuszynie oraz Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. M. Kopernika w Łodzi. Grupę kontrolną stanowiło 29 ochotników. Na badania została wydana zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W obu przedłożonych pracach eksperymentalnych znajduje się opis zawierający podstawowe parametry pacjentów, jednakże brakuje w nich szczegółowej charakterystyki grupy badanej wraz z opisanymi kryteriami włączenia oraz wykluczenia. Ponadto, pomocnym elementem byłby podobny opis grupy kontrolnej, w przypadku której nie są podane nawet informacje dotyczące miejsca i sposobu pobierania krwi.

Doktorantka bardzo płynnie porusza się w zagadnieniu związanym z miRNA oraz niedrobnokomórkowym rakiem płuca, czego dowodem jest włączona w skład rozprawy

tel. +48 42 635 43 36

ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

e-mail: michal.bijak@biol.uni.lodz.pl

www.biol.uni.lodz.pl

doktorskiej praca przeglądowa, która bardzo szczegółowo i dogłębnie przedstawia potencjalną możliwość wykorzystania miRNA jako nieinwazyjnych nowoczesnych, molekularnych biomarkerów wykrywających pojawienie się zmian o charakterze niedrobnokomórkowego raka płuca.

W części eksperymentalnej Doktorantka bazuje na metodzie łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym dokonując analiz przy użyciu komercyjnych sond hybrydujących typu TaqMan. Jest to najczulsza i najbardziej specyficzna metodyka wykrywania ilości poszczególnych cząsteczek miRNA w materiale biologicznym stąd jej wybór przez Doktorantkę zasługuje na pochwałę. MiRNA izolowane było z pobranych guzów przy użyciu Trizolu oraz bezpośrednio z surowicy przy użyciu komercyjnego kitu MirVana. W przypadku badań wykonanych na surowicy nasuwa się bardzo ważne pytanie, dlaczego Doktorantka izolowała materiał bezpośrednio z surowicy a nie wykonała wcześniej procedury izolacji egzosomów?, w których ilość miRNA powinna być znacznie większa.

Testy statystyczne zostały odpowiednio dobrane i opisane, a cała analiza statystyczna wraz z opisanymi wynikami stanowi bardzo mocną część pracy.

Uzyskane wyniki przedstawiono w formie opisowej w czytelny sposób. Doktorantka wykazała podwyższony poziom miR-205-5p i miR-210-3p oraz obniżony poziom miR-30a-5p, miR-126-3p i miR-486-5p w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki prawidłowej. Dodatkowo dzięki analizom dyskryminacyjnym udało się wyselekcjonować dwie cząsteczki: miR-210-3p oraz miR-30a-5p, które są potencjalnymi kandydatami jako markery różnicujące tkankę nowotworową od prawidłowej. Analizy przeprowadzone na surowicy również wykazały zmieniony poziom cząsteczek miRNA u osób chorych w porównaniu z grupą kontrolną. Dokładna analiza statystyczna wykazała, że największy potencjał jako nieinwazyjny biomarker raka płuc posiada miR-210-3p. W przypadku badań korelacyjnych nie zaobserwowano żadnych istotnych zależności pomiędzy poziomem badanych miRNA a stanem pacjentów, cechami nowotworu oraz czasem przeżycia całkowitego.

Doktorantka na zakończenie podsumowuje otrzymane wyniki w czytelny i syntetyczny sposób.

Jako ostatni element pracy przedstawione są trzy wnioski, które konkludują badania oraz analizy odnosząc się do głównego celu postawionego w pracy doktorskiej. Jednak nie do końca odpowiadają one pięciu celom szczegółowym postawionym w pracy, co pozostawia pewien niedosyt. Jednakże pierwsze dwa wnioski mają bardzo duży potencjał naukowy i kliniczny, dzięki czemu prace przygotowane przez Doktorantkę mogą stanowić impuls do

dalszych zakrojonych na szeroką skalę badań nad wykorzystaniem miRNA jako biomarkerów zarówno różnicujących tkankę nowotworową od prawidłowej, jak również pozwalających na wczesne wykrycie we krwi pierwszych informacji o rozwijającym się raku płuca w organizmie.

Prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej są interesujące i dotyczą bardzo ważnego i aktualnego zagadnienia naukowego obejmującego najnowszy trend badawczy, który dąży do poszukiwania wysoce czułych, molekularnych biomarkerów procesów nowotworzenia.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Weroniki Świtlik pt. „Zmiany w ekspresji genów wybranych mikroRNA u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca” posiada bardzo dużą wartość poznawczą i bez wątpienia 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 późniejszymi zmianami). Moje uwagi przedstawione w recenzji nie wpływają na wartość merytoryczną pracy. W związku z czym przekladam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie mgr Weroniki Świtlik do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej.

UNIwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Biochemii Ogólnej

Michał Bijak
dr hab. Michał Bijak