

Kraków, 29 sierpnia 2023 roku

Dr hab. n. med. Mariusz Szuta
Katedra Chirurgii Stomatologicznej Instytutu Stomatologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum



RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PT.:

**„CZĄSTECZKA APRIL W REGULACJI PROLIFERACJI
I APOPTOZY KOMÓREK RAKA PŁASKONABŁONKOWEGO
NOWOTWORÓW GŁOWY I SZYI”**

MAGISTER KINGI HENRYKI NOWACKIEJ

Pracę wykonano w Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Ewy Jabłońskiej będącej promotorem. Rozprawa ma formę monografii o typowym układzie z podziałem na rozdziały: wstęp, założenia i cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie i streszczenie w języku angielskim, piśmiennictwo. Dodatkowo autorka zamieściła przed wstępem wykaz stosowanych skrótów tudzież wykaz rycin i wykaz tabel. Praca liczy 106 stron wraz z piśmiennictwem, zawiera 9 tabel oraz 47 rycin w formie wykresów, schematów, oraz rysunków. Na 172 pozycje piśmiennictwa w całości obcojęzycznego, w większości z ostatnich 10 lat autorami 6 artykułów są Polacy.

We wstępie doktorantka opisała nadrodzinę cząsteczek czynnika martwicy nowotworu (TNFSF, ang. *Tumour Necrosis Factor Super Family*), jej poszczególne ligandy i receptory oraz ich biologiczną rolę. Więcej uwagi autorka dysertacji poświęciła białku APRIL (*A proliferation-inducing ligand*) przedstawiając jego strukturę, proces wytwarzania, wiążące go receptory, szlaki sygnalizacyjne przez niego indukowane oraz rolę tej cząsteczki w procesach fizjologicznych i patologicznych u człowieka ze szczególnym uwzględnieniem zjawiska nowotworzenia. Doktorantka we wstępie zawarła również syntetyczne omówienie istoty procesu apoptozy oraz zewnątrzkomórkowe i mitochondrialne szlaki aktywujące i regulujące proces zaprogramowanej śmierci komórki, scharakteryzowała proliferację komórek nowotworowych tudzież ich unikalny metabolizm zwłaszcza w odniesieniu do glukozy. W rozdziale pierwszym nie zabrakło również podstawowych aktualnych danych epidemiologicznych, demograficznych i etiopatogenetycznych charakteryzujących raka płaskonabłonkowego obszaru głowy i szyi (HNSCC) oraz uproszczony zarys klasyfikacji TNM raka błony śluzowej jamy ustnej, będący kluczowym narzędziem do oceny stopnia zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej.

Choroba nowotworowa towarzyszy ludzkości od zarania dziejów, a walka z nią trwa nadal i pomimo postępu jaki dokonał się niewątpliwie w medycynie nie można nadal powiedzieć, że znane jest współcześnie rozwiązanie jak ją zakończyć. Schorzenia onkologiczne były dawniej rozumiane jako sekretna choroba o której mówiło się wyłącznie szeptem. Dzisiaj nazywane są „dżumą” naszego pokolenia. Prognozuje się, że w przyszłości rak będzie przyczyną 15% zgonów ludzi na świecie i w niektórych krajach stanie się najczęstszą przyczyną śmierci, wyprzedzając schorzenia układu sercowo-naczyniowego. Wysoce prawdopodobnym jest, że na nowotwór zachoruje co trzecia kobieta i co drugi mężczyzna. „Rak”, bo tak potocznie określa się chorobę nowotworową, zwany jest z tego powodu już teraz „cesarzem wszech chorób”.

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem komórek panelu obejmującego linie komórek nowotworowych z grupy nowotworów głowy i szyi (*Head and Neck Cancer Panel, ATCC®*): FaDu (linia komórkowa wywodząca się z guza gardła dolnego), CAL 27 (linia komórkowa wyizolowana w tkanki raka języka 56-letniego białego mężczyzny) i SCC-9 (linia komórkowa wyizolowana w tkanki raka płaskonabłonkowego języka 25-letniego mężczyzny). Do oceny proliferacji wykorzystano test MTT Cell Proliferation assay Kit (Invitrogen™, V13154), apoptozę oznaczano metodą cytometrii przepływowej (ocena wyników za pomocą programu FlowJo), a ekspresję białek PI3K, p-Akt, surwiwiny, Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-xL, kaspazy-3 i kaspazy-9 badano metodą Western blot.

W przeprowadzonych badaniach doktorantka wykazała bezpośrednie działanie rhAPRIL na komórki linii FaDu, CAL27 i SCC-9, wyrażające się znaczącym wzrostem ich proliferacji oraz upośledzeniem apoptozy. Największą wrażliwość na działanie rhAPRIL wykazywały komórki linii SCC-9, zarówno w aspekcie ich proliferacji jak i apoptozy. Wyniki badań wskazały na istotne różnice w ekspresji białek pro- i anti-apoptotycznych nadrodziny Bcl-2 drogi mitochondrialnej i kaspaz w odpowiedzi na działanie rhAPRIL na poszczególne linie komórkowe. Kluczowym białkiem odpowiedzialnym za nasiloną proliferację i upośledzoną apoptozę badanych linii komórkowych HNSCC w odpowiedzi na rhAPRIL jest surwiwina jedynie w komórkach linii CAL 27.

Na podstawie uzyskanych wyników i dokonanych analiz doktorantka wyciągnęła następujące wnioski:

1. Wzrost proliferacji oraz upośledzenie apoptozy w odpowiedzi na rhAPRIL wskazuje na bezpośrednie pronowotworowe działanie cząsteczki APRIL na komórki raka płaskonabłonkowego głowy i szyi linii FaDu, Cal 27 i SCC-9.
2. Największą wrażliwość na działanie rhAPRIL zarówno w aspekcie proliferacji jak i apoptozy wykazują komórki linii SCC-9.

3. Mechanizm hamowania apoptozy w badanych liniach komórkowych w odpowiedzi na działanie rhAPRIL zależy jest w znacznym stopniu od zmian ekspresji pro- i anty-apoptotycznych białek nadrodziny Bcl-2 drogi mitochondrialnej i kaspaz.
4. Różnice w ekspresji badanych białek pro- i anty-apoptotycznych w odpowiedzi na działanie rhAPRIL między badanymi liniami wskazują na zaangażowanie także innych, niż badane, białek drogi mitochondrialnej.
5. Kluczowym białkiem odpowiedzialnym za nasiloną proliferację i upośledzoną apoptozę badanych linii komórkowych HNSCC w odpowiedzi na rhAPRIL jest surwiwina.
6. Spośród badanych linii, komórki Cal 27 odpowiadają na rhAPRIL poprzez szlak PI3K/Akt/surwiwina.
7. Różnice w ekspresji białek szlaku PI3K/Akt w komórkach linii FaDu i SCC-9 wskazują na aktywację innych dróg sygnalizacyjnych w odpowiedzi na rhAPRIL.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr Kingi Henryki Nowackiej posiada klasyczny układ monografii i jest napisana poprawną polszczyzną. Szata graficzna i strona edytorska jest staranna. Kolorowe wykresy, ryciny, schematy i fotografie wzbogacają niewątpliwie znacznie jej walory poznawcze, a spis rycin i tabel ułatwia czytelnikowi odszukiwanie w tekście wybiórczych informacji.

Doktorantka zachowała umiar w objętości całej pracy, jak również adekwatne proporcje poszczególnych jej części. W dysertacji autorka umiejętnie dobrała metody badawcze celem uzyskania obiektywizacji wyników i wykazała się dobrą znajomością warsztatu naukowego, uzyskując rozwiązanie wszystkich problemów badawczych. Wnioski w mojej skromnej ocenie odpowiadają postawionym celom. Dodatkową wartością przedstawionych

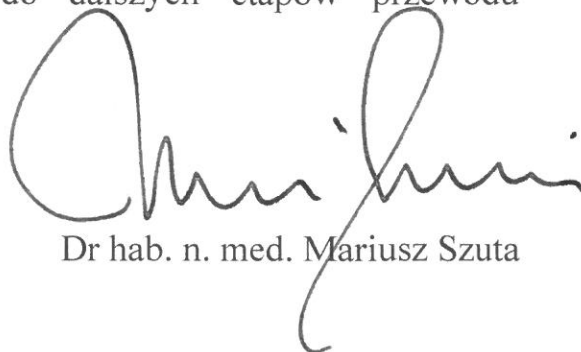
wyników badań *in vitro* jest ich utylitarny charakter dający potencjalną możliwość implementacji w medycynie. Wyniki badań są nowatorskie w wielu aspektach, mają potencjalne zastosowanie praktyczne po wynalezieniu i wdrożeniu leków wpływających na regulację procesów proliferacji i apoptozy komórkowej przez cząsteczkę APRIL, co prowadzić może niewątpliwie do poprawy wyników leczenia chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi.

Z obowiązku recenzenta chcę wskazać, że autorka nie ustrzegła się błędów w pracy, np. na stronie 40 w opisie metodologii używa terminów ketepsyna -3 i katepsyna -9 zamiast kaspaza-3 i kaspaza-9. Nie znalazłem również opisu metod statystycznych, które doktorantka zastosowała w analizie statystycznej wyników. Osobiście uważam też, że temat rozprawy jest niefortunnie sformułowany w aspekcie terminu komórki raka płaskonabłonkowego nowotworów głowy i szyi, co jest pewnego rodzaju persewacją językową.

Moja ogólna i merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej mgr Kingi Henryki Nowackiej pt.: „Cząsteczka APRIL w regulacji proliferacji i apoptozy komórek raka płaskonabłonkowego nowotworów głowy i szyi” zrealizowanej pod opieką prof. dr hab. n. med. Ewy Jabłońskiej jest pozytywna. Praca spełnia formalne kryteria stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych określone w Ustawie o szkolnictwie wyższym i nauce z 20 lipca 2018 roku (Dz. U. z 2022r. poz.574).

Zwracam się zatem do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Kingi Nowackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,



Dr hab. n. med. Mariusz Szuta