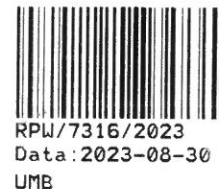


**Prof. dr hab. n. med. Jacek Roliński**  
**KATEDRA I ZAKŁAD IMMUNOLOGII KLINICZNEJ**  
**UNIwersYTET MEDYCZNY W LUBLINIE**



ul. Chodźki 4a  
20-093 Lublin

Tel. (0-81) 448 64 20

fax (0-81) 448 64 21

e-mail: [jacek.rolinski@gmail.com](mailto:jacek.rolinski@gmail.com)

Lublin dn. 14.08.2023r.

### **Ocena**

rozprawy doktorskiej mgr Kingi Henryki Nowackiej zatytułowanej: „Cząsteczka APRIL w regulacji proliferacji i apoptozy komórek raka płaskonabłonkowego nowotworów głowy i szyi” wykonanej w Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

**Promotorem pracy jest Prof. dr hab. Ewa Jabłońska**

Pomimo znacznego postępu jaki dokonał się w ostatnich latach w diagnostyce i terapii nowotworów, większość z nich zwłaszcza tych zaawansowanych nadal pozostaje nieuleczalna. Rozwój badań molekularnych pozwolił na wcześniejszą i skuteczniejszą diagnostykę oraz poznanie biologii komórek nowotworowych. Znaczne osiągnięcia możemy także odnotować w terapii nowotworów. Poza leczeniem chirurgicznym, radioterapią, standardową chemio- a ostatnio immunochemioterapią coraz częściej próbuje się wykorzystać komórki układu odpornościowego do walki z nowotworem, czego przykładem są limfocyty CAR-T.

Badania z ostatnich lat zwracają uwagę na cząsteczki z rodziny cytokin TNF, biorących udział w wielu procesach zarówno fizjologicznych jak i patologicznych. W warunkach fizjologicznych odgrywające one istotną rolę w regulacji przeżycia i różnicowania wielu komórek. Na przykład białko APRIL będące składową tych procesów, reguluje przeżycie prawidłowych komórek B a także ich różnicowanie, dojrzewanie, chemotaksję, przełączanie klas i produkcję przeciwciał. APRIL bierze też udział w patogenezie wielu chorób w tym również nowotworów. Wykazano wysoką ekspresję białka APRIL w raku piersi, żołądka, jajnika, płuc oraz w nowotworach głowy i szyi. Raki płaskonabłonkowe głowy i szyi (HNSCC) są najczęstszymi nowotworami złośliwymi w tej lokalizacji. W patogenezie tych nowotworów podkreśla się rolę czynników środowiskowych. Są również publikacje sugerujące rolę czynników genetycznych w patogenezie HNSCC. Wykazano pewne

predyspozycje zarówno genetyczne, rodzinne a także osobnicze do wystąpienia tych nowotworów. Pewną rolę w procesie kancerogenezy przypisuje się także wirusom, a przede wszystkim wirusowi brodawczaka ludzkiego (HPV). Innymi wirusami mogącym prawdopodobnie stanowić czynnik ryzyka rozwoju raka krtani są wirusy: HSV (Herpes Simplex Virus) oraz EBV (Epstein-Barr Virus).

Doktorantka w ramach rozprawy doktorskiej podjęła próbę oceny roli białka APRIL w regulacji proliferacji i apoptozy komórek raka płaskonabłonkowego nowotworów głowy i szyi. Mechanizmy działania cząsteczki APRIL w w/w nowotworach nie zostały do końca poznane, dlatego też podjęcie przez Doktorantkę tego tematu uważam za w pełni uzasadnione.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Kingi Henryki Nowackiej liczy 106 strony maszynopisu i ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Dysertacja składa się z następujących części: Spis treści, Wykaz najczęściej używanych skrótów, Wykaz rycin i tabel, Wstęp, Założenia i cele pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenia w języku polskim i angielskim oraz Piśmiennictwo.

We Wstępie liczącym 25 stron maszynopisu, Doktorantka opisała nadrodzinę TNF oraz ich biologiczną rolę zarówno receptorów jak i ich ligandów. Szczególną uwagę poświęciła charakterystyce białka APRIL, opisując jego strukturę i wytwarzanie, przedstawiła cząsteczki wiążące to białko (TACI, BCMA, HSPG) oraz kluczowe szlaki sygnalizacyjne indukowane przez APRIL. Następnie przedstawiła fizjologiczną rolę i udział APRIL w patogenezie różnych stanów chorobowych ze szczególnym podkreśleniem roli tej cząsteczki w procesach nowotworowych. Ważną część wstępu stanowi podrozdział poświęcony apoptozie oraz sposobom jej regulacji -szlakom zewnątrz i wewnątrzkomórkowym, kaspazom i innym składowym w/w procesu takim jak np. białka nadrodziny Bcl-2. Końcowa część wstępu przedstawia ogólną charakterystykę komórek nowotworowych, ich metabolizm i czynniki odpowiedzialne za proliferację oraz bardziej szczegółowo opisane zostały badane nowotwory - raki płaskonabłonkowe głowy i szyi. Wstęp został napisany jasnym, zrozumiałym językiem oraz udokumentowany kolorowymi schematami ułatwiającymi czytanie tej części rozprawy. Wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie do dalszych części pracy.

„Założenia i cele rozprawy doktorskiej” przedstawione zostały w formie opisowej oraz w trzech punktach, w sposób logiczny i przekonujący uzasadniających wybór tematu badań. Zakreślone cele są nowatorskie oraz bardzo istotne z punktu widzenia zarówno poznawczego, jak i potencjalnie klinicznego.

W części „Materiały i metody” Doktorantka scharakteryzowała trzy linie komórkowe nowotworów głowy i szyi (z kolekcji ATCC®) wykorzystane do przeprowadzenia badań. Kandydatka szczegółowo opisała metody hodowli w/w linii oraz testy i aparaturę wykorzystaną do dalszych analiz. Do oceny żywotności i apoptozy komórek HNSCC wykorzystowała metodę cytometrii przepływowej. Za pomocą techniki Western blot i przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych przeprowadziła analizę ekspresji białek: PI3K, p-Akt, surwiwina, Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-xL, katepsyna-3 i katepsyna-9. Dobór metod nie budzi zastrzeżeń, jest on bardzo nowoczesny, adekwatny do postawionych celów, a ich opis świadczy o dobrym przygotowaniu praktycznym Doktorantki do przeprowadzenia zaplanowanych badań.

W pierwszej części rozdziału „Wyniki” Doktorantka przedstawiła ocenę proliferacji komórek metodą MTT. Wykazała istotnie wyższą proliferację komórek wszystkich trzech badanych linii (FaDu, CAL 27 i SCC-9) stymulowanych rhAPRIL w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL. W kolejnej części tego rozdziału Doktorantka dokonała oceny apoptozy z wykorzystaniem cytometru przepływowego. Stwierdziła istotnie niższy odsetek komórek HNSCC we wczesnej i późnej fazie apoptozy z dodatkiem rhAPRIL w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL.

W dalszej części Doktorantka przedstawiła wyniki dotyczące ekspresji białek pro-apoptotycznych metodą Western blot. W przypadku białka Bak obserwowała istotnie niższą ekspresję białka po inkubacji z rhAPRIL w porównaniu do komórek inkubowanych bez rhAPRIL. Jedynie w przypadku linii SCC-9 nie obserwowano takich różnic po 48-godzinnej hodowli. Analiza ekspresji białka Bax wykazała istotnie niższą ekspresję tego białka po dodaniu rhAPRIL do hodowli linii FaDu i CAL 27 podczas 24-godzinnej inkubacji, zmian takich nie stwierdzono po 48-godzinnej hodowli ani w przypadku linii SCC-9. Ekspresja białek anti-apoptotycznych w większości hodowli była wyższa po inkubacji z rhAPRIL w porównaniu do ekspresji bez dodatku APRIL:

- 1) Białka Bcl-2 i Bcl-xL w liniach FaDu i SCC-9 po 48 godzinach
- 2) Bcl-2 w komórkach linii CAL 27 zarówno po 24 jak i po 48 godzinach.

Ekspresja kaspazy-3 była niższa istotnie po 24 godzinnej inkubacji w przypadku linii FaDu i CAL 27. Podobnie ekspresja kaspazy -9 w większości hodowli była niższa po inkubacji z APRIL. Ocena białek wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego PI3K/Akt/Surwiwina wykazała, że tylko komórki CAL 27 odpowiadają na inkubacje z rhAPRIL co sugeruje, że w liniach (FaDu i SCC-9) aktywacji ulegają prawdopodobnie inne drogi sygnałowe.

Podsumowaniem przeprowadzonych badań jest siedem wniosków, z których najistotniejszy wg recenzenta jest wniosek pierwszy: „Wzrost proliferacji oraz upośledzenie apoptozy w odpowiedzi na rhAPRIL wskazuje na bezpośrednie pronowotworowe działanie cząsteczki APRIL na komórki HNSCC linii FaDu, CAL 27 i SCC-9”. Zawarte w pozostałych wnioskach stwierdzenia mają pełne pokrycie w wynikach badań i dowodzą realizacji przez Doktorantkę celów pracy. Wydając końcową, opinie o rozprawie doktorskiej, stwierdzam, że rozprawa napisana została z wszechstronną znajomością omawianych problemów a dobór technik badawczych, jak i przeprowadzone doświadczenia, uzyskane wyniki oraz ich analiza statystyczna nie budzą zastrzeżeń. Badania wykonane przez Doktorantkę przyniosły szereg ważnych obserwacji, istotnych dla lepszego poznania roli APRIL w immunopatogenezie nowotworów głowy i szyi. Dyskusja oraz wnioski kończące prace dowodzą wysokich umiejętności i dociekliwości Doktorantki oraz zachęcają do kontynuacji badań. Doktorantka wykazała się dojrzałością naukową i udowodniła umiejętność korzystania z piśmiennictwa naukowego, planowania badań, ich realizacji z doбором odpowiednich metod oraz krytycznej i rzetelnej analizy poczynionych obserwacji.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Kingi Henryki Nowackiej zatytułowana: „Cząsteczka APRIL w regulacji proliferacji i apoptozy komórek raka płaskonabłonkowego nowotworów głowy i szyi” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje teoretyczną wiedzę Doktorantki w zakresie immunologii i patologii nowotworów głowy i szyi. Tym samym rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj Dz.U. z 2022r. poz. 574). Mam zaszczyt wnioskować do Wysokiego Senatu UM w Białymstoku o dopuszczenie mgr Kingi Henryki Nowackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie rozprawy cum laude. Ocenianą rozprawę doktorską wyróżnia nie tylko zastosowanie nowoczesnych metod badawczych, których zakres znacznie wykracza poza zwyczajowe normy przyjęte w pracach doktorskich. Podkreślić należy doskonałe wykorzystanie w/w metod do osiągnięcia zaplanowanych celów oraz wyjątkową rzetelność badawczą jak i doskonałą redakcję rozprawy.

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Immunologii Klinicznej  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
prof. dr hab. n. med. Jacek Rolinski

