



dr hab. Agnieszka Gizak, prof. UWr

Wrocław, 03.07.2023

OCENA

Rozprawy doktorskiej lek med. Macieja Ornata

pt. „Rola ekspresji testyny w rakach niedrobnokomórkowych płuc”

Nowotwory płuc to najpowszechniejsza przyczyna zgonów z powodu chorób nowotworowych w Polsce. Mimo iż ostatnimi czasy obserwuje się spadek zachorowalności na te nowotwory w grupie mężczyzn, to wśród kobiet tendencja jest wzrostowa. Co gorsza, wczesna faza raka płuc ma przebieg bezobjawowy, co skutkuje zbyt późnym rozpoznaniem choroby i złym rokowaniem dla pacjentów.

Testyna jest białkiem, które wydaje się pełnić funkcje supresora migracji, podziałów komórkowych oraz aktywatora apoptozy w pewnych typach nowotworów. Jednak nie prowadzono dotąd badań na niedrobnokomórkowych rakach płuc. Autor recenzowanej rozprawy podjął zatem temat o potencjalnie dużym znaczeniu klinicznym.

Rozprawa doktorska „Rola ekspresji testyny w rakach niedrobnokomórkowych płuc” powstała po opieką prof. dr. hab. Piotra Dzięgiela w Katedrze Morfologii i Embriologii Człowieka Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, którego zespół nie ustaje w poszukiwaniach białek – potencjalnych markerów nowotworzenia oraz celów nowych terapii przeciwnowotworowych. Autor rozprawy, wykorzystując dostęp do niezwykle cennego materiału klinicznego – 208 przypadków raka niedrobnokomórkowego (NSCLC – non-small cells lung cancer) wzbogaconych o pełne dane kliniczno-patologiczne pacjentów, podjął próbę rozwikłania roli testyny w rozwoju tych nowotworów. Wśród analizowanych przypadków były 83 próbki raka typu płaskonabłonkowego (SCC – squamous cell carcinoma) i 120 przypadków typu gruczolowego (AD – adenocarcinoma). Materiał kontrolny stanowił tzw. margines cięcia chirurgicznego. Badania uzyskały zgodę właściwej komisji bioetycznej. Dodatkowym



materiałem badawczym były linie komórkowe fibroblastów ludzkich (IMR-90) oraz raków płuc płaskonabłonkowego (NCI-H1703, NCI-H522) i gruczołowego (A549).

W swoich badaniach Autor rozprawy wykorzystał też surwiwinę (białko uważane za niekorzystny czynnik prognostyczny w nowotworach) oraz Ki67 i kaspazę 3 jako markery, odpowiednio, potencjału proliferacyjnego i apoptozy komórek.

Dokładniej, Autor rozprawy postawił sobie za cel:

- zbadanie lokalizacji testyny w NSCLC,
- ocenę nasilenia ekspresji tego białka oraz surwiwiny i Ki67, jak również zbadanie związku między poziomem ekspresji tych białek a danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów,
- oznaczenie poziomu apoptozy w NSCLC oraz zbadanie jego korelacji z danymi kliniczno-patologicznymi oraz poziomem ekspresji powyższych białek.

Do realizacji tych celów wykorzystany został szeroki wachlarz metod: izolacja RNA z materiału pobranego dzięki mikrodysekcji laserowej, real-time PCR, izolacja białka, Western blot, immunohistochemia na mikromacierzach tkankowych, mikroskopia konfokalna.

Ponadto przeprowadzono dokładną analizę statystyczną uzyskanych danych i sprawdzono szereg zależności między nimi, także w kontekście danych kliniczno-patologicznych pacjentów.

Uzyskane wyniki można podsumować następująco:

Poziom białka testyny jest wyższy w cytoplazmie komórek NSCLC niż komórek zdrowych, pochodzących z marginesu cięcia chirurgicznego. W przypadku SCC skorelowane jest to z wyższym stadium zaawansowania choroby i większą średnicą guza. Wyniki analiz sugerują też ostrożnie niższą przeżywalność w takiej grupie pacjentów i młodszy wiek w momencie diagnozy. W przypadku AC wysoki poziom komórkowej testyny koreluje jedynie z istotnie większymi rozmiarami guza. Bez względu na typ histologiczny nowotworu, wysoki poziom testyny koreluje z większym nasileniem apoptozy i proliferacji komórek. Testyna zatem może promować rozwój NSCLC. Jest to wniosek przeciwstawny do wyciągniętych przez innych badaczy, a dotyczących innych typów nowotworów (np. gruczołu piersiowego, nosogardła czy jelita grubego). W tychże nowotworach poziom testyny był obniżony. Tę niezgodność wniosków Autor rozprawy uznał za słabą stronę swojej pracy. Nie mogę się z tym zgodzić. W



ZAKŁADY WNB

ZAKŁAD FIZJOLOGII I NEUROBIOLOGII MOLEKULARNEJ

ul. H. Sienkiewicza 21

50-335 Wrocław

tel. +48 71 375 40 56 | +48 71 375 40 53

zfnm@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

nauce często przełomowymi okazują się te odkrycia, które są sprzeczne z istniejącą wiedzą (oczywiście, jeśli innym grupom badaczy uda się je potwierdzić). Być może zatem Autor rozprawy odkrył coś, co w przyszłości pozwoli stworzyć terapię modulującą rozwój NSCLC.

W obszernej i szczegółowej „Dyskusji”, opartej o znacznych rozmiarów bibliografię Autor rozprawy sam zresztą nadmienia, że a) w raku żołądka również zaobserwowano nadekspresję testyny, b) istnieją też inne białka uważane za supresory nowotworzenia, których ekspresja w wielu nowotworach jest zwiększona (zwykle dotyczy to zmutowanych form takiego białka). Być może zatem warto przyjrzeć się strukturze białka/mutacjom testyny w NSCLC.

Rozprawa ma jednak również słabsze strony. Przede wszystkim jest to strona edytorska. W rozprawie można znaleźć literówki i niepoprawne językowo/logicznie sformułowania, np.

- Autor miesza j. polski z angielskim w pisząc o przeciwciałach anty-testin, anty-survivin itp.;
- na str. 82 mowa jest o „niejasnej nadekspresji testyny”, na stronie 84 można przeczytać, że „Hipotezę wyjaśniającą uzyskane rezultaty są przytoczone powyżej rozważania...”, a na 87 o tym, że „analiza nasilenia procesów apoptozy oraz indeksu proliferacyjnego przekładała się na gorsze rokowanie pacjentów z NSCLC”;
- w „Metodach” czytamy o „odwirowywaniu kolumnienki” – oczywiście, była ona w wirówce, ale opisując przygotowanie kawy Autor nie napisałby chyba o „zaparzeniu szklanki”...;
- nie bardzo rozumiem, czym jest „dysproporcja w obrębie jąder potomnych na biegunach dzielącej się komórki”;
- uważam też, że określenie „jądrowa/cytoplazmatyczna ekspresja białka” to żargon, którego warto unikać w pracach naukowych – chodzi bowiem o lokalizację, a nie miejsce ekspresji genu w komórce. Jednak – jak pokazuje PubMed – Autor rozprawy ma duże doświadczenie w pisaniu publikacji naukowych, zatem być może jest to ogólnie przyjęty zwrot w naukowym świecie medycznym, a ja nie do końca potrzebnie się czepiam.
- nagłówek Wykresu 1 też brzmi jak żargon: „Ekspresja m RNA *TES* na liniach komórkowych...”.

Mam też kilka nieco poważniejszych uwag.

- 1) We „Wstępie”, który jest bardzo obszerny, Autor rozprawy ze znawstwem opisuje



zagadnienia niezbędne czytelnikowi do zorientowania się we współczesnym stanie wiedzy dotyczącym diagnostyki i klasyfikacji nowotworów. Brakuje jednak kilku zdań wprowadzenia: rozdział ten zaczyna się od opisu roli testyny, surwiwiny i Ki67, czytelnik jednak nie może się zorientować, czemu ten opis służy (poza opisem testyny, która pojawia się w tytule rozprawy). Zwłaszcza, że „Cele pracy” znajdują się dopiero na stronie 24, a streszczenia w j. polskim i angielskim na końcu pracy. Jest to bardzo niefortunne umiejscowienie streszczeń, jednak ponieważ spotykam się z tym po raz kolejny, najwyraźniej takie są wytyczne Uczelni. Byłoby korzystniejszym dla czytelnika, by rozdział „Uzasadnienie podjęcia tematu”, znajdujący się przed celem pracy znalazł się przed rozdziałem „Wstęp” lub był jego pierwszą częścią.

2) To nie Autor rozprawy ocenia jej wartość naukową, jak ma to miejsce w rozdziale „Uzasadnienie podjęcia tematu”. Jest to rola czytelników i recenzentów rozprawy.

3) Poszczególne sekcje rozdziału „Wyniki przeprowadzonych badań” często rozpoczynają się bardzo nietypowo, bo od ryciny, po której dopiero następuje opis uzyskanych wyników.

4) Rycina 1 przedstawia intensywność fluorescencji związanej z testyną, w różnych liniach komórkowych, wraz z wykresem przedstawiającym kwantyfikację tego sygnału. Jednak wg mnie ani wykres, ani opis wyników w tekście nie odzwierciedla tego, co pokazują zdjęcia. W szczególności, w komórkach fibroblastów ludzkich na zdjęciu absolutnie nie widać żadnej fluorescencji odpowiadającej testynie, natomiast wg Autora poziom ten miałby być porównywalny do tego, obserwowanego w linii komórkowej raka płaskonabłonkowego.

Nasuwają mi się również pewne pytania:

1) Na jakiej podstawie Autor rozprawy (str. 84) zalicza testynę do grupy 4 (niestabilne mRNA, produkt białkowy o krótkim czasie półtrwania), po czym dywaguje o wzroście stabilności białka w nowotworach, gdy naturalniejszym wydaje się przypisanie jej do grupy 2 (niestabilne mRNA, produkt białkowy o długim czasie półtrwania)?

2) Skoro testyna jest uważana za białko supresorowe, to czy Autor rozprawy brał pod uwagę, że jej podwyższona ekspresja w nowotworach może być skutkiem, a nie przyczyną nowotworzenia, tzn. stanowić mechanizm obronny, który z jakiegoś powodu nie spełnił swojej funkcji?



3) Czy wysoki poziom ekspresji kaspazy 3, towarzyszący wysokiemu indeksowi proliferacyjnemu w niektórych rakach (i skorelowany z gorszymi rokowaniami) można próbować wyjaśnić nie-apoptotyczną funkcją tej kaspazy? Co Autor wie na temat takiej funkcji?

Mimo uwag i pytań nie mam wątpliwości, że Autor rozprawy postawił kolejny krok na drodze prowadzącej do lepszego poznania patogenezy NSCLC, pokazując przy okazji jak istotna jest analiza uzyskanych wyników w powiązaniu z danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 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.) oraz stawiam wniosek o dopuszczenie lek. med. Macieja Ornata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Agnieszka Gizak, prof. UWr