

dr hab. Antonina Mazur, prof. UWr
antonina.mazur@uwr.edu.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. Agaty Beaty Forkasiewicz

**pt.: „Rola białka LDH-A w ucieczce przed apoptozą komórek raka przełyku w odpowiedzi na
TNF- α ”**

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Augoff

na Wydziale Nauk Medycznych

Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy badań podstawowych mających na celu ustalenie, czy manipulacja poziomem bądź aktywnością enzymu dehydrogenazy mleczanowej (ang. *lactate dehydrogenase*, LDH) mogłaby mieć wpływ na odpowiedź komórek raka przełyku na czynnik martwicy nowotworów α (ang. *tumor necrosis factor α* , TNF- α). Rak przełyku, który cechuje się złym rokowaniem, jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów na Świecie. Wobec powyższego prowadzenie badań podstawowych, mających na celu zrozumienie etiopatogenezy tego typu nowotworu, jest uzasadnione. Badania przeprowadzone przez lek. Agatę Forkasiewicz są ważne, ponieważ polegały na zbadaniu wzajemnego wpływu badanych przez nią białek na m.in. ucieczkę komórek raka przełyku przed programowaną śmiercią komórki, czyli apoptozą oraz zdolności migracyjne ww. komórek.

Rozprawa doktorska, obejmująca 93 strony, ma typowy układ dla tego typu prac. Jest podzielona na następujące rozdziały: **Wprowadzenie**, **Cel pracy**, **Prace związane z niniejszą rozprawą**, **Wyniki**, **Dyskusja**, **Wnioski**, **Materiały i metody** oraz **Literatura**. Uważam, że trzeci rozdział nie powinien być znaleźć się w rozprawie, skoro w opisach wybranych rycin było napisane, gdzie pokazane wyniki zostały wykorzystane. Wydaje mi się, że niezbyt dobrym zabiegiem było



umieszczenie rozdziału poświęconego materiałom i metodom po wnioskach końcowych. Przed analizą wyników naturalnym jest zaznajomienie się z zastosowanymi procedurami, aby móc przejść do części opisującej uzyskane rezultaty. W rozprawie przed spisem treści znajdują się ponadto **Streszczenia** w językach polskim oraz angielskim, które są dość długie. Każde z nich mieści się na czterech stronach, co w zasadzie nie koresponduje z definicją streszczenia. Pisząc o strukturze pracy, wspomnę także o tym, że brakuje wykazu skrótów. Jest to o tyle istotne, że Autorka rozprawy często nie tłumaczy skrótów, które pojawiają się w tekście (np. FC).

Wstęp został bardzo dobrze napisany, co powoduje, że czyta się go płynnie. Znajdują się w nim informacje dotyczące biologii raka przełyku, jego typów oraz czynników, które mają wpływ na inicjację tego typu nowotworu. W tym rozdziale poruszane są także kwestie dotyczące powiązania procesu zapalnego z rozwojem raka przełyku, a także roli dehydrogenazy mleczanowej w procesie nowotworzenia. Ciekawi mnie, jaką rolę przypisuje się TNF- α w inicjacji, promocji i progresji raka przełyku. Interesuje mnie także mechanizm, dzięki któremu TNF- α poprzez aktywację kinazy Erk1/2 prowadzi do „lokowania” MMP9, CD26 oraz FAP- α w tratwach lipidowych. Czy Doktorantka mogłaby podczas obrony odnieść się do tych kwestii? Czy mogłabym także prosić o wytłumaczenie w trakcie obrony, czym są „cytozolowe kompleksy indukujące śmierć (IIa, IIb lub IIc)” (str. 30 i 31) oraz „połączenia adherentne” w kontekście mikrośrodowiska guza (str. 33)? Inna moja prośba dotyczy wytłumaczenia efektu Pasteura, o którym Doktorantka pisze na str. 40. Mam w tym miejscu jeszcze kilka drobnych zastrzeżeń. W opisie do tabel 2, 3 i 4 oraz rycin 1 i 2 brakuje podania odniesień literaturowych. Kinaza NIK nie została pokazana na rycinie 2. Czy hierarchia czynników ryzyka predysponująca do rozwoju raka przełyku pokazana w tabeli 4 została ustalona przez Doktorantkę?

W kolejnym rozdziale Doktorantka jasno nakreśla, jaki **Cel** przyświecał jej pracy. Główny cel Doktorantki został odzwierciedlony w tytule rozprawy doktorskiej.

W części „**Wyniki**” Autorka rozprawy właściwie przedstawia rezultaty swoich badań, które częściowo zostały opublikowane. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są wartościowe i przyczyniają się do lepszego zrozumienia, jakie funkcje pełni TNF- α w progresji raka przełyku. Najciekawszymi wynikami dla mnie są te dotyczące wpływu TNF- α na migrację badanych komórek. Mam do Doktorantki kilka pytań odnośnie wyników, mam też kilka zastrzeżeń do tej części rozprawy. Wydaje mi się, że nie należało spodziewać się spektakularnych wyników z eksperymentów, w których obniżano poziom LDHA za pomocą siRNA, ponieważ poziom białka spadał w obu liniach o ok. 40-60%, a to jest za mało, aby doszło do znacznego spadku ilości produkowanego przez LDHA mleczanu, a w konsekwencji do zmian w analizowanych parametrach. To tłumaczyłoby, dlaczego nie zaobserwowano zmian m.in. w ilości uwalnianego mleczanu (str. 53). Można było zoptymalizować

proces wyciszania ekspresji *LDHA* poprzez przetestowanie innych odczynników do transfekcji komórek siRNA bądź zwiększenie ilości zastosowanego siRNA. Czy były prowadzone takie optymalizacje? O ile dobrze zrozumiałam, to w trakcie realizacji ocenianej pracy została wyprowadzona linia komórkowa EC7, co stanowi wartość dodaną tej pracy. Nie podano w niej jednak charakterystyki nowej linii komórkowej. Z zainteresowaniem przeczytałam publikację, którą Doktorantka wymienia w trzecim rozdziale, lecz także w niej brakuje charakterystyki tych komórek. Czy zostały przeanalizowane jakieś specyficzne dla komórek raka przełyku markery? W rozprawie doktorskiej zostało wspomniane, że ta linia komórkowa charakteryzuje się cechami komórek macierzystych (str. 59). Czy mogłabym prosić o więcej szczegółów na ten temat? Czy bardzo wysokie stężenia oksamatu sodu (25 i 50 mM) są stężeniami, które są powszechnie stosowane i nie wywołującymi skutków ubocznych? Porównując ryciny 6, 7 i 9, można wysnuć wniosek, że sam oksamat sodu w zastosowanych stężeniach ma pewien proapoptotyczny i antyproliferacyjny wpływ na komórki. Szkoda, że nie pokuszono się o szerszą zakrojoną analizę IHC skrawków z guzów EC. Zwiększenie liczby analizowanych przypadków w połączeniu z np. analizą pięcioletniego wskaźnika przeżywalności pacjentów mogłoby przynieść wartościowe wyniki, szczególnie gdyby przypadki byłyby podzielone na podtypy ESCC i EAC, choć guzów podtypu ESCC byłoby zapewne znacznie mniej.

Czasami brakuje kompletu rezultatów dla danej linii komórkowej bądź pokazane są niekompletne wyniki. Ma to miejsce np. dla analizy cytometrycznej ilości komórek apoptotycznych w badanych warunkach. Te eksperymenty zostały wykonane tylko dla komórek EC7 (Ryc. 6 i 7). Innym przykładem jest test migracji (Ryc. 10), gdzie analizę wpływu TNF- α w kombinacji z wyciszeniem ekspresji *LDHA* lub zahamowaniem aktywności *LDHA* na zdolności migracyjne w warunkach 2-D wykonano tylko dla komórek KYSE150. Zastanawia mnie także, dlaczego nie policzono komórek KYSE150 po podaniu oksamatu sodu (test proliferacji, Ryc. 9). Szkoda, że test MTT (Ryc. 9) nie został wykonany także po 72 h, skoro różnice w liczbie komórek są obserwowane właśnie dopiero po 72 h (test proliferacji, Ryc. 9). Poza kwestiami formalno-edytorskimi, które omawiam poniżej, nie mam już innych zastrzeżeń do tej części rozprawy.

W Dyskusji Autorka rozprawy krytycznie odnosi się do uzyskanych wyników i porównuje je z danymi opisanymi w dostępnej literaturze. Ta część rozprawy jest bardzo dobrze napisana. Na podstawie lektury tej części rozprawy można wysnuć wniosek o dojrzałości naukowej Doktorantki. W tym rozdziale zostały dodatkowo wyartykułowane opinie, co w następnej kolejności powinno zostać zrobione / zbadane. Podoba mi się, że Doktorantka ma przemyślenia na ten temat. Bardzo dobrym

zabiegiem było umieszczenie po Dyskusji krótkiego rozdziału **Wnioski**. Systematyzuje to najważniejsze osiągnięcia Doktorantki.

W rozdziale **Materiały i metody** zostały dość wyczerpująco opisane protokoły poszczególnych eksperymentów. Brakuje mi w tej części rozprawy wyodrębnionego podrozdziału dotyczącego zastosowanych materiałów. Zauważyłam, że Doktorantka, wymieniając odczynniki podczas opisywania wybranej procedury, podawała firmę oraz numer katalogowy. Niestety nie zawsze te informacje zostały zamieszczone (np. dla przeciwciał rozpoznających kaspazę 3 lub 8). Czy mogłabym prosić o wytłumaczenie, na czym polega „trypsynizacja różnicowa” (str. 65)?

Przechodząc już do oceny rozprawy pod kątem formalno-edytorskim, należy zwrócić uwagę na fakt, że praca została napisana poprawnie pod kątem językowym i jest starannie zredagowana. Pojawiło się w niej niewiele literówek, drobnych błędów gramatycznych oraz interpunkcyjnych. Głównym moim zastrzeżeniem jest tutaj używanie skrótów myślowych oraz niefortunnych wyrażzeń, np., „Zapalenie w raku” (tytuł jednego z podrozdziałów); „Monocyty w TME polaryzują klasycznie do prozapalnych makrofagów typu M1 lub alternatywnie [...]” (str. 34); „[...] poprzez indukcję cząsteczki adhezji komórek naczyńnicowych-1 (VCAM-1) [...]” (str. 36). Doktorantka pisze także nagminnie o ekspresji białek (str. 2, 21, 27, 29 i w wielu innych miejscach). Sformułowania „ekspresja” i „nadekspresja” odnoszą się do genu. Możemy napisać „ekspresja LDHA”, ale w odniesieniu do białka LDHA piszemy o jego poziomie. Przeszkadza mi także pisanie o „normalnych” komórkach (str. 12, 41, 42, 45 czy 58), podczas gdy Autorka rozprawy ma na myśli komórki prawidłowe. Obie powyższe kwestie wynikają z zastosowania kalki z języka angielskiego. Drobniejsze niedociągnięcia wymieniam poza recenzją.

Doktorantka wymienia 222 pozycji w części **Literatura**. Prawie połowa zacytowanych źródeł (ponad 100) pochodzi z ostatnich 10 lat. Pozycje literaturowe zostały prawidłowo dobrane, co świadczy o właściwym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki. Nie rozumiem tylko, dlaczego w spisie literatury poszczególne pozycje są numerowane, skoro lista źródeł została uszeregowana zgodnie z alfabetem, a w tekście zacytowane pozycje są wymieniane z zachowaniem nazwisk pierwszych autorów. Mam tutaj także zastrzeżenie dotyczące cytowania źródeł internetowych. Nie zostały one wymienione w części „**Literatura**”, nie zostały także podane daty dostępu do tych źródeł.

Pomimo wymienionych błędów oraz uchybień recenzowana praca charakteryzuje się sporą wartością poznawczą. Założony cel został w większości zrealizowany. Doktorantka wykazała, m.in., że zahamowanie aktywności LDHA nie powoduje zwiększenia puli komórek apoptotycznych po podaniu TNF- α . Zaprezentowane w rozprawie doktorskiej rezultaty, dotyczące zdolności migracyjnych komórek w badanych warunkach, zostały opublikowane w 2023 r. w artykule pt.: „*Effect*

of LDHA Inhibition on TNF- α -Induced Cell Migration in Esophageal Cancers” w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*. Doktorantka jest pierwszym autorem tego artykułu. Autorka rozprawy jest także pierwszym autorem pracy przeglądowej pt.: „*The usefulness of lactate dehydrogenase measurements in current oncological practice*” opublikowanej w czasopiśmie *Cellular & Molecular Biology Letters* w 2020 r. Praca ta jest tematycznie powiązana z zagadnieniami poruszonymi w rozprawie doktorskiej.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. Art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2018 poz. 1668). **Reasumując, przedstawiam Wysockiej Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne wnioski o dopuszczenie lek. Agaty Beaty Forkasiewicz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.**

Przykładowe usterki stylistyczne, edytorskie, itd.:

nazwy łacińskie bakterii powinny być pisane kursywą;

tytuły i opisy tabel powinny znajdować się nad nimi, a nie pod nimi;

zamiast polskich skrótów opisujących stężenia wyrażone w % znajdują się angielskie (w/v zamiast w/o czy v/v zamiast o/o);

Ryc. 3 – istotności statystyczne powinny być zaznaczone nad słupkami, których to dotyczy;

str. 21 „eksom” – powinno być egzom;

str. 28 i w wielu innych miejscach „zewnątrkomórkowa” – powinno być pozakomórkowa;

str. 31 – „promujących zapalenie i przeżycie” – skrót myślowy;

str. 40 – „formy splicingowe” – czy chodzi tutaj o izoformy białka, czyli różne wersje białka produkowane na podstawie tego samego genu dzięki alternatywnemu składaniu mRNA?

str. 56 i 58 – „synergizuje efekt” oraz „mogą synergizować z” – czy to nie są skróty myślowe?

str. 67 – czy określenie „wpolimeryzowana” jest prawidłowe?

str. 68 oraz inne miejsca – „wizualizowano” - to jest nieprawidłowa kalka z języka angielskiego.