



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCIPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpl. dnia	06-12-2024
L. dz. RN-BM/	

Wrocław, dnia 28.11.2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

lek. Tomasza Górnickiego

pt. „Rola białka RBMS 3 w raku gruczołu piersiowego”

wykonanej w

Katedrze Morfologii i Embriologii Człowieka

Zakład Histologii i Embriologii

Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

pod opieką

Promotora Prof. dr hab. n med. Piotra Dziegiela

Promotora pomocniczego dr inż. Agnieszki Rusak

1 Cup



OCENA METODOLOGICZNA I FORMALNA PRACY

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji dysertacja lek. Piotra Górnickiego zatytułowana „Rola białka RBMS 3 w raku gruczołu piersiowego” ma postać cyklu publikacji powiązanych tematycznie. Cykl stanowią 2 publikacje oryginalne oraz 1 publikacja będąca pracą przeglądową:

1. **Górnicki Tomasz**, Lambirow J, Mrozowska M, Podhorska-Okołów M, Dzięgiel P, Grzegorzółka J. Role of RBMS3 Novel Potential Regulator of the EMT Phenomenon in Physiological and Pathological Processes. *Int J Mol Sci* 2022 Sep 17;23(18):10875.
DOI: 10.3390/ijms231810875
IF: 5,6 **pkt MEiN 140**
2. **Górnicki Tomasz**, Lambirow J, Mrozowska M, Romanowicz H, Smolarz B, Piotrowska A, Gomulkiewicz A, Podhorska-Okołów M, Dzięgiel P, Grzegorzółka J. Expression of RBMS3 in Breast Cancer Progression. *Int J Mol Sci* 2023 Feb 2;24(3):2866.
DOI: 10.3390/ijms24032866
IF: 4,9 **pkt MEiN 140**
3. **Górnicki Tomasz**, Lambirow J, Mrozowska M, Krawczyńska K, Staszko N, Kmiecik A, Piotrowska A, Gomulkiewicz A, Romanowicz H, Smolarz B, Podhorska-Okołów M, Grzegorzółka J, Rusak A, Dzięgiel P. Impact of RBMS3 Progression on Expression EMT Markers. *Cells* 2024, Sep 13, 1548
DOI: 10.3390/cells13181548
IF: 5,1 **pkt MEiN 140**

Podkreślić należy, że wszystkie prace składające się na cykl zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR o wysokich współczynnikach wpływu oraz dużej liczbie punktów MEiN o **sumarycznej wartości IF wynoszącym 15,6 oraz sumarycznej Punktacji Ministerialnej (pkt MEiN) wynoszącej 420**. Praca będąca publikacją przeglądową opublikowana została w 2022 roku w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (IF=5,6, 140 pkt MEiN), natomiast dwie prace oryginalne w 2023 roku w *International Journal of Molecular Sciences* (IF=4,9, 140 pkt MEiN), a ostatnia w cyklu publikacja ukazała się w 2024 roku w *Cells* (IF=5,1, 140 pkt MEiN).

We wszystkich publikacjach składających się na cykl będący podstawą rozprawy, Doktorant jest **pierwszym Autorem**. Warta podkreślenia jest również pozycja lek. Tomasza Górnickiego jako **autora korespondencyjnego we wszystkich publikacjach** składających się na rozprawę doktorską, co wskazuje na znaczący i wiodący udział Doktoranta zarówno w projektowaniu i wykonaniu badań jak i przygotowywaniu manuskryptów wskazanych



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

IM. LUDWIKA HIRSZFELDA

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

publikacji. Jednocześnie skład autorski tych publikacji wskazuje na duże wsparcie i współdziałanie zespołu badawczego w realizacji badań.

Pierwsza publikacja to praca przeglądowa, w której Doktorant usystematyzował aktualny stan wiedzy dotyczący roli białka RBMS3 w procesach fizjologicznych oraz patologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem inicjacji i progresji nowotworów litych.

W drugiej, oryginalnej publikacji Autor przedstawił wyniki badań przeprowadzone na dużej grupie pacjentek z inwazyjnym przewodowym rakiem piersi (n=524) ekspresji białka RBMS3, będącego obiektem badań Doktoranta. Warte podkreślenia jest wyróżnienie przyznane Panu Górnickiemu przez Kapitułę nagrody "*Laur Medyczny im. Doktora Wacława Mayzla*" za tę oryginalną pracę badawczą dotyczącą roli ekspresji białka RBMS3 w raku gruczołu piersiowego, jak również powstawaniu i rozwojowi innych typów nowotworów.

W publikacji tej Autor przedstawił wyniki oceny lokalizacji i intensywności ekspresji motywu wiążącego RNA RBMS3 w materiale klinicznym przy użyciu reakcji immunohistochemicznych (IHC) w przypadkach przewodowego raka piersi (*in vivo*) oraz poziomu ekspresji RBMS3 zarówno na poziomie białka, jak i mRNA w liniach komórkowych raka piersi (*in vitro*). Ponadto, dane uzyskane w badaniach *in vivo* i *in vitro* zostały skorelowane z profilami kliniczno-patologicznymi pacjentek.

W kolejnej, trzeciej z cyklu, a drugiej oryginalnej publikacji naukowej, stanowiącej bezpośrednie rozwinięcie badania z drugiej z cyklu publikacji, lek. Tomasz Górnicki z zespołem skupił się na transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej (ang. *Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT) skutkującej zmianą fenotypu komórek z nabłonkowego na mezenchymalny oraz roli białka RBMS3 w tym procesie, a w szczególności zbadania roli motywu wiążącego RNA jednoniciowego białka interakcyjnego 3 (RBMS 3).

W obu badaniach opisanych w pracach oryginalnych Autor zaprezentował wyniki uzyskane przy wykorzystaniu zarówno podstawowych jak i zaawansowanych metod biologii molekularnej odpowiednio dobranych do uzyskania założonego celu.

Przygotowana przez Doktoranta Dysertacja liczy łącznie z piśmiennictwem 104 strony i posiada tradycyjny układ dla tego typu rozpraw doktorskich: spis treści (strona 4), wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską (strona 5), wykaz zastosowanych skrótów (strona 6), streszczenie w języku polskim i angielskim (strony 7-10 oraz 11-13, odpowiednio), wstęp (strony 14-16), cele (strona 17), materiały i metody (strony 18-20), podsumowanie wyników (strony 21-24), wnioski (strona 25), etyka badań (strona 26), opinię Komisji Bioetycznej (Nr KB-625/2022, strona 27-28), piśmiennictwo (strony 29-31), publikacje wchodzące w skład cyklu (strony 32-84), *Curriculum Vitae* (strony 85-87), dorobek naukowy (strony 88-90) oraz oświadczenia współautorów (strony 91-104). Podsumowując, układ recenzowanej dysertacji jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań.

Rozprawa jednoznacznie wykazuje indywidualny wkład Kandyda przy tworzeniu koncepcji, wykonywaniu części badawczej, opracowaniu i interpretacji wyników publikacji naukowych składających się na cykl publikacji powiązanych tematycznie. Rozprawa spełnia



również kryteria formalne (art.187) Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2020 poz. 85 z późn. zm.).

lek. Tomasz Górnicki obecnie jest asystentem w grupie badawczej w Zakładzie Histologii i Embriologii Zakładu Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu oraz jako stażysta w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym we Wrocławiu.

Poza wspomnianą wcześniej nagrodą *Laur Medyczny im. Wacława Mayzala* Pan Tomasz Górnicki jest również Laureatem Stypendium w programie NAWA Walczak. Jest również aktywnym Członkiem w 3 organizacjach naukowych. Co warte podkreślenia, to lek. Tomasz Górnicki jest współautorem złożenia patentowego (Nr zgłoszenia P.446307 z dnia 05.10.2023) dotyczącego „*Scaffold, sposób jego uzyskiwania oraz zastosowania*”.

Ponadto lek. Tomasz Górnicki jest współautorem 11 publikacji naukowych o sumarycznym współczynniku wpływu (IF) wynoszącym 46,414 oraz 1 390 pkt MEiN oraz 4 doniesień konferencyjnych. Index Hirscha (wg. WOS) wynosi 6.

Złożone przez Współautorów oświadczenia dołączone przez Autora jednoznacznie wskazują na Jego wiodącą rolę w prowadzonych badaniach i przygotowaniu publikacji naukowych będących podstawą recenzowanej Dysertacji.

Poprawność formułowania problemów, hipotez, założeń badawczych

Doktorant przejrzyście i rzeczowo precyzuje w Autoreferacie założenia i cel pracy, którym jest określenie roli ekspresji białka RBMS3 w raku gruczołu piersiowego, który zrealizowany został w oparciu o:

- analizę profilu ekspresji białka RBMS3
- wpływu białka RBMS3 na ekspresję markerów EMT

w materiale klinicznym pozyskanym od pacjentek z inwazyjnym przewodowym rakiem gruczołu piersiowego (ang. *invasive ductal breast cancer*, IDC) oraz z wykorzystaniem funkcjonalnych modeli *in vitro* (linii komórkowych) w kontekście danych kliniczno-patologicznych.

Ponadto Pan Górnicki sformułował 5 celi szczegółowych, które systematyzują i porządkują obrany schemat badawczy:

1. Ocena lokalizacji oraz nasilenia poziomu ekspresji białka RBMS3 w materiale klinicznym guzów przy zastosowaniu reakcji immunohistochemicznych.
2. Określenie korelacji poziomu ekspresji białka RBMS3 w materiale klinicznym z ekspresją markerów procesu EMT: TWIST 1, SNAIL, SLUG, ZEB 1, N-kadheryny, E-kadheryny przy zastosowaniu reakcji immunohistochemicznych.
3. Ocena poziomu ekspresji RBMS3 na poziomie mRNA oraz białka w liniach komórkowych raka gruczołu piersiowego przy zastosowaniu metody quantitative real time PCR (RT-qPCR) oraz Western Blot.



4. Korelacja uzyskanych rezultatów z wykorzystaniem metody immunohistochemicznej w materiale klinicznym oraz danymi kliniczno-patologicznymi pacjentek ze zdiagnozowanym inwazyjnym przewodowym rakiem gruczołu piersiowego.
5. Określenie wpływu wyciszenia ekspresji białka RBMS3 oraz nadekspresji tego białka na poziom kluczowych markerów EMT: TWIST 1, SNAIL, SLUG, ZEB 1, N-kadheryny, E-kadheryny w liniach komórkowych raka gruczołu piersiowego MDA-MB-231 oraz SKBR-3.

Przedstawiony wyżej cel główny rozprawy, razem z celami szczegółowymi, wyznaczają ramy obszaru badawczego. Cel główny i cele szczegółowe pracy zostały sformułowane poprawnie, są one ściśle, konkretne oraz określają istotę podjętego problemu, metodę badań oraz przewidywane rezultaty. Zarówno cel główny jak i cele szczegółowe mają zakresy uzasadniające przygotowanie rozprawy awansowej.

Doktorant w pełni zrealizował założony cel swojej rozprawy, prezentując opracowanie o właściwych walorach merytorycznych i poznawczych, w pełni odpowiadających wymogom rozprawy doktorskiej. Istotną wartością wzbogacającą wartość przedłożonej rozprawy doktorskiej byłoby sformułowanie hipotezy badawczej, której realizację wskazały założone cele badawcze.

Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania

Założenia i metody pracy, dobór technik badawczych i analiza uzyskanych wyników nie budzą zastrzeżeń. Warsztat technik jest wyważony, zapewnia uzyskanie jednoznacznych wyników przy przyjętych metodach walidacji i weryfikacji. Świadczy o dużej wiedzy Doktoranta oraz odpowiedzialności naukowej. Dane biologiczno-doświadczalne są starannie udokumentowane i opisane.

Badania oryginalne Pan Górnicki prowadził na materiale klinicznym pozyskanym od pacjentek z inwazyjnym przewodowym rakiem gruczołu piersiowego (ang. *invasive ductal breast cancer*, IDC) w kontekście danych kliniczno-patologicznych oraz z wykorzystaniem funkcjonalnych modeli *in vitro* (linii komórkowych). Materiałem badawczym Autora były zabezpieczone tkanki pozyskane od Pacjentek ze zdiagnozowanym inwazyjnym rakiem przewodowym (IDC) oraz tkanek mastopatii po uzyskaniu świadomej zgody uczestników badania. Materiał zabezpieczony został w Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki, a badanie przeprowadzone zostało zgodnie ze standardami etycznymi i uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (decyzja nr. KB 625/2022 25.08.2022).

Analizując dane wskazane przez Doktoranta w rozprawie doktorskiej oraz publikacje naukowe będące podstawą recenzowanej dysertacji i załączone do opracowania zwraca uwagę rozbieżność we wskazaniach wielkości grupy pacjentek. W rozprawie Autor wskazuje liczbę 490, podczas gdy w obu pracach oryginalnych wskazana jest liczba 524. Ponadto, w obu



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

pracach oryginalnych wskazana jest rozbieżna ilość preparatów tkanek mastopatii (n=26 i 27). Proszę o wyjaśnienie tej rozbieżności.

Profil ekspresji RBMS3 w materiale klinicznym Autor uzyskał wykorzystując technikę o wysokiej przepustowości mikromacierzy tkankowej (ang. *Tissue Microarrays* (TMAs)), klasycznych metod immunohistochemicznych (IHC), natomiast badania z wykorzystaniem modeli komórkowych Doktorant prowadził z wykorzystaniem technik Western blot i RT-qPCR na czterech liniach komórkowych raka piersi, reprezentujących typy nowotworów o rosnącej agresywności (MCF-7: luminal A, BT-474: luminal B, SK-BR-3: HER2-wzbogacony i MDA-MB-231: potrójnie ujemny), oraz uniesmiertelnionej linii komórkowej komórek nabłonka piersi (HME1-hTERT) (Me16C) stanowiącej kontrolę prawidłową referencyjną.

Z kolei model *in vitro* wykorzystany w badaniach mających na celu określenie wpływu progresji RBMS 3 na ekspresję markerów EMT (trzecia publikacja wskazana w cyklu i druga oryginalna praca badawcza) oparto o dwie linie komórkowe raka piersi reprezentujące typy molekularne HER-2 i TNBC (SKBR-3 i MDA-MB-231, odpowiednio) z zastosowaniem modelu wyciszenia i nadekspresji białka RBMS3 i technik badawczych: Western blot, RT-qPCR, modyfikacji profilu ekspresji RBMS3 w zastosowanych modelach komórkowych poprzez lentiwirusową transdukcję komórek (model z wyciszoną ekspresją białka RBMS3 oraz nadekspresją tego białka), a następnie odpowiedni warsztat technik obrazowych i pomiarowych mających na celu jakościowy i ilościowy opis profilu kluczowych markerów EMT: TWIST 1, SNAIL, SLUG, ZEB 1, N-kadheryny, E-kadheryny.

Warsztat metod statystycznych wykorzystany przez Doktoranta jest adekwatny, umiejętnie i prawidłowo dobrany zapewniając jednocześnie prawidłową analizę uzyskanych wyników. Analizy Autor wykonał w profesjonalnych, komercyjnych programach statystycznych (Prism 9.0 i Prism 10.0 (GraphPad Software) oraz Statistica 13.3 (Tibco Software, Inc.).

Wnioski są wyważone i wynikają z przeprowadzonych badań, wyników i ich analizy.

Dobór piśmiennictwa, umiejętność wykorzystywania źródeł

Piśmiennictwo wskazane w Autoreferacie obejmuje 34 pozycje bezpośrednio związane z tematyką pracy - są właściwie dobrane i odpowiednio cytowane. Piśmiennictwo wskazane w poszczególnych publikacjach składających się na cykl obejmuje odpowiednio 81, 31 oraz 51 pozycji.

OCENA MERYTORYCZNA PRACY

Temat pracy, trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości: IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Doktorant podjął niezwykle ważny, zarówno klinicznie jak i społecznie, problem jakim jest znalezienie użytecznego klinicznie markera wspomagającego opiekę kliniczną osób chorujących na raka piersi. Rak piersi stanowi poważny problem zdrowotny na całym świecie, szczególnie wśród kobiet. Rak piersi stanowi około 30% wszystkich zachorowań na nowotwory złośliwe wśród kobiet w krajach europejskich. Odpowiada on za 16,6% zgonów z powodu chorób nowotworowych w tej populacji. W Polsce sytuacja kształtuje się podobnie – rak piersi odpowiada za około 1/4 zachorowań na nowotwory u kobiet oraz nieco ponad 1/8 zgonów z tego powodu. Dane Krajowego Rejestru Nowotworów wskazują, że w ostatniej dekadzie nastąpiła poprawa stopnia zaawansowania raka piersi w momencie rozpoznania. Stanowi około 23% wszystkich zachorowań z powodu nowotworów złośliwych u kobiet i około 14% zgonów z tego powodu. Szacuje się, że rocznie raka piersi rozpoznaje się u 1,5 miliona kobiet na całym świecie, a około 400 tysięcy umiera. Odsetek kobiet z nowotworem *in situ* zwiększył się z 3% do 7%, a pacjentek ze stadium miejscowego zaawansowania przekracza 50%. Analiza wskaźników przeżyć 5-letnich wskazuje, że w krajach skandynawskich przekraczają one 80%, podczas gdy w Polsce oscylują w granicach 75–77%. Oznacza to, że pomimo widocznego postępu w leczeniu raka piersi w naszym kraju wyniki terapii wciąż są gorsze niż średnia europejska. W 2020 r. zarejestrowano w Polsce 17 511 nowych zachorowań (współczynnik zachorowalności 50,0/100 000) na raka piersi u kobiet, a 6956 chorych zmarło z powodu tego nowotworu (współczynnik umieralności 14,7/100 000). Rak piersi sporadycznie występuje również u mężczyzn (około 150 zachorowań rocznie). Biorąc pod uwagę zmiany demograficzne zachodzące w polskiej populacji, a także rosnące tempo zachorowalności, szacuje się, że liczba nowych przypadków raka piersi w Polsce może przekroczyć 21000 rocznie już w 2025 roku. Współczynniki zachorowalności mogą wówczas osiągnąć poziom około 60 na 100000 kobiet.

Biorąc pod uwagę przytoczone dane statystyczne wybrana przez Doktoranta jednostka chorobowa jest w centrum zainteresowania nie tylko naukowego, czy medycznego ale i społecznego. Dostępna wiedza jednoznacznie wskazuje, iż nie podłoże molekularne tej choroby jest złożone, jednak kluczowy wpływ wdają się mieć czynniki związane ze stanem hormonalnym kobiety (czynniki reprodukcyjne, wiek pokwitania i przekwitania, stosowanie preparatów hormonalnych) zaś istotnym molekularnym czynnikiem znacząco zwiększającym ryzyko zachorowania jest obecność mutacji genu *BRCA1* lub *BRCA2*. Szacuje się, że 4-8% raków piersi może być wynikiem dziedzicznych mutacji, pozostałe przypadki są następstwem sporadycznych mutacji w komórkach somatycznych. Ponadto ostatnie dekady i postęp w badaniach molekularnych jednoznacznie potwierdziły, iż rak piersi jest chorobą heterogenną molekularnie.

W odpowiedzi na potrzebę poszukiwania skutecznego i użytecznego klinicznie markera wspomagającego zarówno diagnostykę jak i monitorowanie raka piersi, bazując na złożonej patofizjologii tej choroby jak i dostępnej wiedzy naukowej podstaw molekularnych onkogenezy i progresji nowotworowej, Doktorant podjął się zbadania użyteczności klinicznej



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

białka RBMS3 jako potencjalnego markera mogącego wspomóc diagnostykę i monitorowanie inwazyjnego przewodowego raka gruczołu piersiowego (ang. *invasive ductal breast cancer*, IDC). Ponadto Doktorant rozpoczął badania mające na celu finalnie określenie potencjału wykorzystania RBMS3 jako celu molekularnego dla leków przeciwnowotworowych a więc jako przyszły potencjalny cel spersonalizowanych terapii IDC.

Wybór białka RBMS3 Doktorant dokonał na podstawie udokumentowanych danych wskazujących istotne zaangażowanie RBMS3 w regulację ekspresji i/lub stabilizacji miRNA, hamowanie szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina i innych czynników transkrypcyjnych związanych z EMT, wskazując jednocześnie RBMS3 jako obiecujący czynnik prognostyczny w monitorowaniu nowotworów. Natomiast funkcji RBMS3 jako TSG i jego udowodniona zdolność do hamowania migracji nowotworów i zdolności inwazyjnych wskazała tę cząsteczkę jako dobry kandydat do nowych spersonalizowanych ukierunkowanych molekularnie terapii. Potwierdza to fakt, iż modyfikacja, z wykorzystaniem technik edycji genomu, powodująca zwiększoną ekspresję RBMS3 może potencjalnie poprawić wyniki standardowych terapii w wielu typach nowotworów. Co więcej, zwiększona ekspresja RBMS3 może zapobiegać tworzeniu mikroprzerzutów, które są zbyt małe, aby można je było wykryć w diagnostyce obrazowej i mogą prowadzić do nawrotu choroby.

Mocną stroną badań przeprowadzonych w ramach prezentowanej rozprawy jest dobrze zaplanowane badanie, wnikliwe zapoznanie się z dostępną wiedzą naukową w poruszanej tematyce oraz dbałość o precyzyjny warsztat naukowo-badawczy. Świadczy to o dobrym przygotowaniu Doktoranta do tematyki pracy doktorskiej, przemyślanym i krytycznym planowaniu badania, skrupulatnej analizie dostępnych danych literaturowych. Szczegółowy opis podstaw molekularnych wybranej do badań molekuly jak i jego zaangażowania w jeden z głównych mechanizmów przerzutowania nowotworu oraz samej jednostki chorobowej wskazuje na dobrą orientację w tematyce badawczej oraz, przede wszystkim świadczy o dobrej intuicji naukowej w wyborze tematu badawczego.

Dlatego też, w mojej opinii podjęcie badań dotyczących tej choroby jest niezwykle istotne naukowo, medycznie i społecznie a ich wyniki, wskazujące na potrzebę dalszej kontynuacji, po uzyskaniu jednoznacznego potwierdzenia znajdą translację z obszaru nauki do sektora biotechnologicznego i medycznego. Podjęcie tematu badawczego będącego tematem niniejszej dysertacji już zaowocowało oryginalnymi i ciekawymi wynikami naukowymi istotnie wzbogacającymi wiedzę naukową w dyscyplinie.

Podsumowując, wyniki opisane w recenzowanej rozprawie doktorskiej stanowią znaczący wkład w dotychczasową wiedzę naukową i medyczną dotyczącą raka piersi i są niezwykle istotne z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, gdyż otwierają perspektywy praktycznego zastosowania zarówno w diagnostyce, terapii jak i monitorowaniu omawianej choroby. Rozprawa wskazuje indywidualny wkład Kandydata zarówno w tworzeniu koncepcji, wykonywaniu części badawczej, opracowaniu i interpretacji wyników ocenianej pracy.



Uzyskane rezultaty i ich znaczenie dla nauki i praktyki

Autor potrafił w bardzo przystępnej, syntetycznej formie przedstawić całość zagadnienia, naświetlić cele i przebieg badań zaś wyniki badań podsumował w 6 wnioskach.

Uzyskane przez Doktoranta wyniki jednoznacznie wskazują na potencjał badanego białka RBMS3 jako ważnego czynnika w transformacji nowotworowej. Przeprowadzone badania dostarczyły lek. Tomaszowi Górnickiemu wystarczających dowodów na sformułowanie następujących wniosków wskazujących, iż:

1. Wyższy poziom ekspresji białka RBMS3 w komórkach inwazyjnego przewodowego raka gruczołu piersiowego, w porównaniu do nienowotworowych tkanek gruczołu piersiowego (mastopatii), może wskazywać na rolę RBMS3 w procesie transformacji nowotworowej.
2. Wyższy poziom ekspresji białka RBMS3 w komórkach podścieliska, w stosunku do komórek inwazyjnego przewodowego raka gruczołu piersiowego, może sugerować odmienną rolę tego białka w obydwu kompartmentach.
3. Korelacja wyższego poziomu ekspresji białka RBMS3 w komórkach nowotworowych, z dłuższym czasem przeżycia pacjentów, może wskazywać na supresyjną rolę RBMS3 w inwazyjnym przewodowym raku gruczołu piersiowego.
4. Korelacja poziomu ekspresji białka RBMS3 z wybranymi markerami EMT w materiale klinicznym może sugerować rolę RBMS3 w procesie EMT.
5. Zależność poziomu ekspresji wybranych markerów EMT od zmian poziomu białka RBMS3 w modelu funkcjonalnym *in vitro* potrójnie negatywnego raka gruczołu piersiowego może wskazywać na promującą proces EMT rolę tego białka w tym podtypie nowotworu.
6. Zależność poziomu ekspresji wybranych markerów EMT od zmian poziomu białka RBMS3 w modelu funkcjonalnym *in vitro* inwazyjnego przewodowego raka gruczołu piersiowego o podtypie HER-2 dodatnim może wskazywać na hamującą proces EMT rolę tego białka w tym podtypie nowotworu.

Przegląd systematyczny przeprowadzony przez Autora w publikacji nr 1 został oparty o dostępne dane literaturowe znajdujące się w dniu 12 grudnia 2021 r w bazie danych czterech dużych medycznych baz danych - PubMed, Embase, Ovid i Scopus. Kluczem do wyboru publikacji źródłowych we wszystkich przeszukiwanych bazach danych były identyczne słowa kluczowe: RBMS3, RNA-binding motif single-stranded-interacting protein 3, rbms3, cancer, EMT. Po pierwszym etapie selekcji Autor uzyskał 474 pozytywne rekordy, które następnie przeanalizował pod kątem powtarzających się artykułów. Ten etap poskutkowało kwalifikacją 76 pełnotekstowych publikacji. Ostateczną selekcję i włączenie do bazy źródłowej publikacji poglądowej była analiza publikacji po pierwszym etapie selekcji pod kątem istotności i



przeanalizowana w oparciu o kryteria włączenia, co ostatecznie spowodowało finalną bazę źródłową wykorzystaną w publikacji w ilości 64 pełnotekstowych powiązanych tematycznie z tematem poruszonym w publikacji własnej Autora artykułów naukowych. Niniejszy przegląd przedstawia aktualny stan wiedzy na temat roli RBMS3 w procesach fizjologicznych i patologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem kancerogenezy. Autor krytycznie analizuje dostępne dane naukowe analizujące mechanizmy molekularne leżące u podstaw roli RBMS3 w omawianych procesach i krytycznie wskazuje konieczność dalszych badań w tym obszarze. Wskazuje również na istotną limitację dostępnej wiedzy dotyczącej tego białka, a mianowicie na wystarczający poziom danych dotyczących roli ekspresji RBMS3 w różnych typach zdrowych tkanek ludzkich oraz ich efektu funkcjonalnego. Ponadto, Doktorant skupił się nie tylko na dostępnych danych w kontekście raka piersi, ale analizując dostępne dane w kontekście innych nowotworów. Szczegółowo i krytycznie dokonuje również analizy znaczenia białka RBMS3 w procesie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT), przy czym szczegółowo analizują podstawy molekularne tego procesu.

W drugiej, doświadczalnej publikacji naukowej Doktorant przeprowadził badanie własne i dokonał oceny lokalizacji i intensywności ekspresji motywu wiążącego RNA RBMS3 (przy użyciu reakcji immunohistochemicznych (IHC)) w materiale klinicznym przewodowego raka piersi (*in vivo*) oraz poziomu ekspresji RBMS3 zarówno na poziomie białka, jak i mRNA w funkcjonalnym modelu komórkowym (*in vitro*). Autor uzyskane w badaniach *in vivo* i *in vitro* dane skorelował z profilami kliniczno-patologicznymi Pacjentek. Do analizy wartości predykcyjnej całkowitego przeżycia ekspresji RBMS3 na poziomie mRNA zastosował metodę Kaplana-Meiera. Cytoplazmatyczna ekspresja RBMS3 obserwowana była zarówno w komórkach raka piersi i komórkach zrębu, natomiast jej poziom w komórkach zrębu był znamienne statystycznie wyższy w komórkach zrębu w porównaniu do komórek kontrolnych i nowotworowych ($p < 0,0001$). Kolejną istotną obserwacją było wykazanie istotnie niższej ekspresji RBMS3 w próbkach raka w porównaniu z tkankami mastopatii ($p < 0,001$). Ponadto Autor wskazał istotnie zwiększoną ekspresję RBMS3 skorelowaną z konkretnym statusem molekularnym guza - HER2(+) ($p < 0,05$) i ER(-) ($p < 0,05$).

W badaniach opartych na modelu *in vitro*, Autor wykazał statystycznie istotnie wyższą ekspresję RBMS3 mRNA w linii komórkowej SK-BR-3 w porównaniu ze wszystkimi innymi liniami komórkowymi ($p < 0,05$). Wykazano dodatnią korelację między ekspresją RBMS3, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, a dłuższym całkowitym przeżyciem.

Uzyskane wyniki wskazywać mogą RBMS3 jako potencjalny nowy cel dla rozwoju spersonalizowanych metod leczenia, oraz jako potencjalny marker dobrego rokowania - wskaźnik dłuższego całkowitego przeżycia.

W trzecim badaniu stanowiących cykl publikacji powiązanych tematycznie Autor analizował rolę motywu wiążącego RNA jednoniciowego białka interakcyjnego 3 (RBMS 3) w procesie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT). Przeprowadził analizę korelacji ekspresji białka RBMS3 z uznanymi markerami EMT: TWIST 1, SNAIL, SLUG, ZEB 1, N-



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości: IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

kadheryną i E-kadheryną. Przeprowadzone badania potwierdziły związek RBMS 3 z markerami EMT. Ponadto przeprowadził badanie *in vitro* z wykorzystaniem modeli komórkowych potrójnie negatywnego i HER-2 dodatniego raka piersi z nadekspresją i wyciszeniem RBMS 3. Przeprowadzone badania sugerują, że RBMS 3 może potencjalnie działać jako czynnik promujący EMT w najbardziej agresywnym podtypie raka piersi, potrójnie negatywnym raku piersi (TNBC), natomiast jako supresor EMT w podtypie HER-2 dodatnim. Wyniki tego badania wskazują na złożoną rolę RBMS 3 w regulacji procesu EMT i przedstawiają go jako przyszły potencjalny cel spersonalizowanych terapii i marker diagnostyczny w raku piersi.

Podsumowując, badania przeprowadzone przez lek. Tomasza Górnickiego mają zatem istotne implikacje poznawcze i kliniczne. Autor w pełni uzyskał odpowiedzi na założony cel badawczy będący podstawą badań objętych tematem niniejszego doktoratu, a przeprowadzone badania stanowią **element nowości, stanowiący oryginalne osiągnięcie Doktoranta**. Dane kliniczno-doświadczalne są starannie udokumentowane i opisane. Prezentowane w ocenianej dysertacji oryginalne osiągnięcie naukowe lek. Tomasz Górnicki stanowi istotny wkład w dotychczasową wiedzę naukową dotyczącą patomechanizmu raka piersi, natomiast w kontekście badanej cząsteczki stanowią znaczący wkład w dotychczasową wiedzę naukową i medyczną dotyczącą roli tego białka w onkologii, ze szczególnym uwzględnieniem jego roli w patomechanizmie raka piersi i są niezwykle istotne z punktu widzenia poznawczego i translacyjnego (aplikacyjnego), gdyż otwierają perspektywy praktycznego zastosowania zarówno w diagnostyce jak i monitorowaniu omawianej choroby. Mają też wysoki potencjał aplikacyjny w sektorze biotechnologicznym, szczególnie w rynku biomedycznym. **Dostrzegalną, praktyczną implikacją kliniczną osiągnięć naukowych Doktoranta opisanych w recenzowanej dysertacji jest możliwość i konieczność uwzględnienia profilowania molekularnego w precyzyjnej diagnostyce, monitorowaniu jak i w opracowaniu zindywidualizowanych celowanych schematów terapeutycznych co w konsekwencji pozwoli na zastosowanie nowoczesnych leków celowanych molekularnie.**

Poprawność językowa, stylistyczna i interpunkcyjna

Rozprawa doktorska napisana jest poprawnym językiem z użyciem prawidłowej stylistyki i terminologii. Edycja pracy jest prawidłowa.

UWAGI I PROPOZYCJE

Przedstawiona do recenzji Rozprawa Doktorska lek. Tomasza Górnickiego jest przygotowana starannie i przejrzysto.

Z obowiązku Recenzenta chciałabym zwrócić uwagę o drobnych mankamentach jakimi są:



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

1. faktyczna wielkość próby materiału klinicznego - analizując dane wskazane przez Doktoranta w rozprawie doktorskiej oraz publikacje naukowe będące podstawą recenzowanej dysertacji i załączone do opracowania zwraca uwaga rozbieżność we wskazaniach wielkości grupy pacjentek. W rozprawie Autor wskazuje liczbę 490, podczas gdy w obu pracach oryginalnych wskazana jest liczba 524. Ponadto, w obu pracach oryginalnych wskazana jest rozbieżna ilość preparatów tkanek mastopatii (n=26 i 27). Proszę w wyjaśnienie tej rozbieżności.
2. niespójność faktycznej ilości stron ocenianej Dysertacji z danymi zawartymi w spisie treści oraz numeracji na stronach opracowania.
3. brak hipotezy badawczej - istotną wartością wzbogacającą wartość przedłożonej rozprawy doktorskiej byłoby sformułowanie hipotezy badawczej, której realizację wskazały założone cele badawcze.

Jednakże wskazane zastrzeżenie jest marginalne i absolutnie w żaden jednak sposób nie umniejszają wartości pracy.

Po wnikliwej lekturze dysertacji zatytułowanej „*Rola białka RBMS 3 w raku gruczołu piersiowego*” oceniam ją bardzo wysoko.

Jest to obszerne i samodzielne opracowanie i rozwiązanie oryginalnego zagadnienia naukowego przy użyciu nowoczesnych metod i jest dowodem umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Ponadto, wyniki prowadzonych badań jak i manuskrypt znalazły uznanie w gronie Recenzentów uznanych czasopism naukowych, gdzie zostały opublikowane.

PODSUMOWANIE

Zdaniem Recenzenta, oceniana **dysertacja doktorska lek. Tomasza Górnickiego** pt. „*Rola białka RBMS 3 w raku gruczołu piersiowego*” wykonana w pod opieką promotora prof. dr hab. n med. Piotra Dzięgiela oraz promotora pomocniczego dr inż. Agnieszki Rusak **spełnia kryteria przypisane rozprawom na stopień naukowy doktora** zdefiniowane w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2020 poz. 85 z późn. zm.). Recenzowana przez mnie **rozprawa doktorska autorstwa lek. Tomasza Górnickiego** prezentuje adekwatną ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie oraz **umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej potwierdzonej publikacją wyników będących podstawą rozprawy doktorskiej w renomowanych czasopismach naukowych o znaczącym współczynniku wpływu. Przedmiotem rozprawy jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego a indywidualny wkład Kandydata w powstanie tej pracy jest wystarczający i udokumentowany.**



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Dlatego zwracam się do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Tomasza Górnickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wartość naukową przeprowadzonych badań oraz dorobek naukowy Autora wnioskuję do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lek. Tomasza Górnickiego.

INSTYTUT IMMUNOLOGII
I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. Ludwika Hirsztfelda
Polskiej Akademii Nauk
ZAKŁAD TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
LABORATORIUM IMMUNOPATOLOGII
53-114 Wrocław, ul. Rudolfa Weigla 12
NIP: 896-000-56-96

Laboratorium Immunopatologii
Andrzej Pawlak
dr hab. n. med. Eminentia, prof. PAN
Kierownik

