

Sosnowiec, 17.02.2022 r.

Katedra Biologii Molekularnej
Zakład Biologii Molekularnej
Zakład Nutrigenomiki
i Bromatologii
Wydział Nauk
Farmaceutycznych
w Sosnowcu

41-200 Sosnowiec
ul. Jedności 8
www.biolmol.sum.edu.pl

KIEROWNIK KATEDRY
KIEROWNIK ZAKŁADU
BIOLOGII MOLEKULARNEJ
dr hab. n. med.
Joanna Gola, prof. SUM
jgola@sum.edu.pl

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 364 12 34
fax: (+48 32) 364 12 34
email:biolmolfarm@sum.edu.pl



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

**Recenzja rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk
medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk medycznych**

lek. Roberta Kiełbasińskiego

**pt. *Zmiany wzorca ekspresji genów kodujących wybrane
adipokiny i czynniki prozapalne w raku endometrium***

Rak endometrium to jeden z najczęściej występujących nowotworów ginekologicznych, szczególnie w krajach rozwiniętych. Zachorowalność na ten nowotwór stale rośnie. W Polsce zajmuje on czwarte miejsce pod względem liczby przypadków. Najczęściej rak endometrium występuje u kobiet w wieku około- i postmenopauzalnym. Wczesna diagnoza jest niezwykle istotna dla powodzenia terapii. Pomimo rozwiniętej diagnostyki raka endometrium nadal poszukiwane są biomarkery, które będą miały wysoką wartość prognostyczną, a także posłużą do monitorowania terapii. Badania molekularne materiału pochodzącego od pacjentek z rakiem endometrium są niezwykle cenne, gdyż przyczyniają się do wskazania potencjalnych markerów diagnostycznych, prognostycznych i terapeutycznych, niezależnie od indywidualnych różnic molekularnych występujących u pacjentek. Zatem, dają możliwość wskazania „uniwersalnych” markerów molekularnych. Z drugiej jednak strony, badania na modelach *in vitro* pozwalają na zbadanie reakcji komórek nowotworowych na zastosowaną terapię w izolowanym układzie, dając możliwość wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych np. za lekooporność. W przypadku raka endometrium niezwykle istotne jest poznanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za powstawanie lekooporności w aspekcie hormonów i czynników prozapalnych. Jest to istotne z tego względu, że ryzyko zachorowania na ten nowotwór znacznie wzrasta u kobiet z nadwagą lub otyłością. Przerost tkanki tłuszczowej skutkuje zaburzoną gospodarką hormonalną, a także prowadzi do przewlekłego stanu zapalnego, rozrostu sieci naczyń i stałej ekspresji cytokin i czynników wzrostowych.

Wymienione czynniki, a w szczególności stan zapalny i zaburzona gospodarka hormonalna tkanki tłuszczowej, są obecnie wskazywane jako czynniki zwiększające ryzyko rozwoju procesu nowotworowego. Niezwykle ważne jest zbadanie czy komórki nowotworowe charakteryzują się ekspresją genów kodujących hormony tkanki tłuszczowej oraz czynniki prozapalne, a także zbadanie czy ekspresja tych genów ulega zmianie pod wpływem leków przeciwnowotworowych.

Z tego względu badania podjęte przez lek. Roberta Kietbasińskiego uważam za zasadne i niezwykle istotne.

Przedstawiona do recenzji rozprawa obejmuje 87 stron. Posiada typowy dla dysertacji doktorskiej układ, jest podzielona na siedem głównych rozdziałów. Pracę uzupełniają wykaz skrótów, tabel, rycin oraz streszczenia w języku polskim i angielskim (zbyt rozbudowane). Tytuł rozprawy odpowiada treści w niej zawartej. Doktorant wnikliwie przeanalizował dostępne piśmiennictwo i zacytował 160 prac, głównie anglojęzycznych. Co ważne, większość cytowanego piśmiennictwa pochodzi z ostatnich pięciu lat przed rokiem przygotowania dysertacji (tylko 56 prac pochodzi z wcześniejszych lat). Umiejętność właściwego doboru piśmiennictwa i jego cytowania świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktoranta.

Wstęp przedstawia informacje dotyczące epidemiologii, etiologii i oceny zaawansowania raka endometrium, a także opis cech histopatologicznych oraz objawów raka endometrium. We wstępie Doktorant opisał także aspekty dotyczące badań z zastosowaniem hodowli komórkowych, przedstawił modele *in vitro* wykorzystywane w badaniach nad rakiem endometrium, a także aktualne informacje dotyczące wybranych czynników prozapalnych i adipokin oraz ich udziału w procesie nowotworzenia. W ostatnim podrozdziale wstępu zostały przedstawione informacje dotyczące cisplatyny, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów jej działania oraz stosowania w leczeniu raka endometrium. Z obowiązku recenzenta muszę wskazać błędy w zastosowanych skrótach (ADP jako symbol adiponektyny; AMT zamiast ATM), a także niekompletność opisu udziału TNF- α w nowotworzeniu. Cytokina ta aktywuje kinazy MAP, zarówno szlaki powiązane z reakcją zapalną, jak i szlak mitogenny ERK, co jest istotne z uwagi na podjęte badania dotyczące udziału czynników prozapalnych w raku endometrium. Ponadto, pominięto aspekt kotwiczenia TNF- α w błonie komórkowej i jego aktywności biologicznej w tej formie. Pomimo tej uwagi, pragnę podkreślić, że całość wstępu bardzo dobrze wprowadza w zagadnienia stanowiące przesłanki do podjęcia badań przedstawionych w pracy. Wstęp uzupełnia tabela dotycząca klasyfikacji zaawansowania klinicznego raka endometrium

wg klasyfikacji FIGO. Na uwagę zasługują cztery ryciny przedstawiające opisywane szlaki sygnałowe i mechanizmy molekularne, co znacznie ułatwia zrozumienie przedstawionych we wstępie treści.

Główny cel pracy stanowiła ocena zmian wzorca ekspresji genów kodujących wybrane adipokiny i czynniki prozapalne w hodowli komórkowej raka endometrium linii Ishikawa ekspozowanej na działanie cisplatyny w porównaniu do hodowli kontrolnej. Doktorant wyodrębnił dwa zadania badawcze:

1. Ocena cytotoksyczności cisplatyny względem raka trzonu macicy w porównaniu do hodowli nietraktowanej lekiem (kontrola);
2. poszukiwanie korelacji pomiędzy ekspresją wybranych genów na poziomie transkryptomu i proteomu.

Przeprowadzone badania miały na celu zweryfikowanie czterech hipotez badawczych:

1. cisplatyna charakteryzuje się efektem cytotoksycznym wobec komórek raka endometrium linii Ishikawa w zależności od dawki i czasu ekspozycji komórek na lek;
2. cisplatyna wpływa na ekspresję wybranych genów kodujących czynniki prozapalne w hodowli raka endometrium linii Ishikawa;
3. cisplatyna wpływa na profil ekspresji genów kodujących wybrane adipokiny w hodowli raka endometrium linii Ishikawa;
4. istnieje zależność pomiędzy profilem ekspresji genów kodujących czynniki prozapalne i adipokiny.

Co ważne, do tej pory nie badano wpływu cisplatyny na komórki linii Ishikawa w takim zakresie, co podkreśla oryginalność i nowatorstwo przedstawionych w dysertacji badań. Szkoda, że Doktorant nie wyekspozował nowatorstwa i znaczenia podjętych badań w postaci krótkiego wprowadzenia do tego rozdziału. Pomimo tej drobnej uwagi należy podkreślić, że cel badań, zadania badawcze oraz hipotezy badawcze zostały jasno sprecyzowane i są w pełni zgodne z tematem pracy.

Rozdział „Materiał i metody” został podzielony na siedem głównych podrozdziałów. W pierwszej kolejności Doktorant przedstawił warunki hodowli raka endometrium linii Ishikawa ekspozowanej na cisplatynę. Następnie została opisana metodyka oceny cytotoksyczności cisplatyny, ekstrakcji oraz oceny ilościowej i jakościowej RNA, metodyka wyznaczenia transkryptomu techniką mikromacierzy oligonukleotydowych, RT-qPCR w czasie rzeczywistym (walidacja wyników) oraz testów ELISA. W ostatnim podrozdziale została opisana analiza statystyczna. Metodyka badań została przedstawiona bardzo szczegółowo, umożliwiając tym samym pełne odtworzenie całości eksperymentu.

Z obowiązku recenzenta muszę jednak wskazać pewne nieścisłości. Opis procedury przygotowania RNA do analizy transkryptomu techniką mikromacierzy oligonukleotydowych zawiera kilka błędów. Na przykład, znakowanie biotyną aRNA odbywa się poprzez wbudowywanie znakowanych nukleotydów podczas jego syntezy a nie po jej zakończeniu. Ponadto, fragmentację aRNA przeprowadza się po zakończeniu syntezy, przed przystąpieniem do składania mieszaniny hybrydizacyjnej. Przedstawione uwagi nie umniejszają temu co niezwykle istotne w przedstawionej dysertacji, czyli wybór metodyki badań. Szeroki zakres wykorzystanych metod badawczych podnosi znacznie wartość merytoryczną pracy i potwierdza umiejętność planowania eksperymentu naukowego. Jest to tym bardziej istotne, iż badania *in vitro* nie są łatwe do wykonania. Wymagają bowiem właściwego doboru metod badawczych, wnikliwego zaplanowania kolejnych etapów eksperymentu oraz ich skrupulatnej realizacji.

Rozdział „Wyniki” został podzielony na sześć podrozdziałów przedstawiających kolejno wyniki: analizy cytotoksyczności, oceny profilu ekspresji leptyny, adiponektyny i ich receptorów na poziomie mRNA, oceny profilu ekspresji czynników prozapalnych na poziomie mRNA, stężenia leptyny i adiponektyny na poziomie białka, stężenia czynników prozapalnych na poziomie białka oraz wyniki analizy zależności pomiędzy oznaczonymi parametrami. Podział uzyskanych wyników na poszczególne podrozdziały ułatwia odniesienie do celu pracy, wyodrębnionych zadań badawczych i weryfikowanych hipotez. Wyniki zostały przedstawione za pomocą licznych tabel i rycin. Sposób przedstawienia wyników jest czytelny. W rozdziale pojawiło się jednak kilka drobnych błędów, które nie umniejszają wartości przedstawionych wyników (sulforodamina A zamiast B; błędy w numerach przywołanych w tekście rycin i tabel oraz ich opisach). Należy podkreślić, że przedstawione wyniki badań stanowią o konsekwentnej realizacji postawionego celu pracy i pozwalają na weryfikację hipotez badawczych.

Dyskusja stanowi niezwykle interesującą lekturę. Doktorant konsekwentnie i rzetelnie omawia uzyskane wyniki w świetle aktualnych danych z piśmiennictwa. Bardzo cenne jest wskazanie zmian w ekspresji adiponektyny i leptyny, co potwierdza udział tych adipokin w odpowiedzi komórek raka endometrium na leczenie cisplatyną. Zatem stanowi przesłankę do podjęcia kolejnych badań w aspekcie wykorzystania tych parametrów jako markerów terapeutycznych i prognostycznych u chorych z rakiem endometrium, jak również możliwości opracowania nowych strategii terapeutycznych - wyciszania ekspresji leptyny i stymulacji ekspresji adiponektyny. Ponadto, Doktorant przedstawił ciekawe spostrzeżenia dotyczące mechanizmu działania cisplatyny na komórki raka endometrium. Jego zdaniem

uzyskane wyniki przemawiają za tym, że cisplatyna nie tylko wpływa na strukturę DNA i procesy molekularne, ale także, poprzez wpływ na ekspresję badanych genów, może modulować takie procesy jak proliferacja komórkowa czy angiogeneza. W kolejnej części dyskusji zostały omówione wyniki dotyczące profilu ekspresji *IL-6*, *TNF-α*, *JAK2* i *STAT3*. Interpretacja braku korelacji ekspresji *TNF-α* na poziomie mRNA i białka budzi pewne wątpliwości. *TNF-α* jest cytokiną, która występuje w formie rozpuszczalnej (wolnej) i zakotwiczonej w błonie komórkowej. Jest to o tyle istotne, że *TNF-α* w formie błonowej wykazuje aktywność biologiczną skutkującą aktywacją szlaków sygnałowych wpływających na szereg procesów molekularnych i biologicznych. Zatem ocena stężenia *TNF-α* w medium hodowlanym nie odzwierciedla całkowitej puli tego białka, które może być także obecne na powierzchni komórek. Stąd prawdopodobnie brak korelacji pomiędzy ekspresją na poziomie mRNA i białka. Podniesienie w dyskusji aspektu możliwego udziału cząsteczek miRNA w regulacji ekspresji *TNF-α* jest bardzo ciekawym spostrzeżeniem, jednak zamieszczenie takiego wniosku bez oznaczenia profilu miRNA i analizy predykcyjnej interakcji miRNA względem mRNA dla *TNF-α* jest zbyt daleko idące (wniosek 3). Sprostowania wymaga także stwierdzenie: „*Jeśli pomiędzy cząsteczką mRNA a miRNA występuje pełna komplementarność, dochodzi do degradacji białka kodowanego przez gen.*” Czy na pewno dochodzi do degradacji białka? Ponadto, wyjaśnienia wymagają następujące fragmenty: na str. 53: „*W pierwszej kolejności oceniono wrażliwość komórek raka endometrium linii Ishikawa, która reprezentuje fenotyp raka w stopniu histopatologicznego różnicowania G1, w którym diagnozuje się największy odsetek przypadków na cisplatynę*”; na str. 57: „*Poza określeniem zmian stężeń adiponektyny i leptyny w ramach niniejszej pracy oceniono także zmiany ekspresji *IL-6*, *TNF-α*, *JAK2* i *STAT3* oraz kodowanych przez nie białek w hodowli raka endometrium pod wpływem endometrium.*” Przytoczone fragmenty zapewne są wynikiem omyłek słownych i nie umniejszają wartości całego rozdziału, który został napisany w sposób świadczący o dużej wnikliwości i krytycznym spojrzeniu na uzyskane wyniki. Wielowątkowość i umiejętność uwzględniania różnych aspektów w interpretacji wyników sprawiają, że dyskusję czyta się z ogromnym zainteresowaniem. Bardzo ciekawą część dyskusji stanowi fragment dotyczący interpretacji wyników oceny ekspresji genów kodujących *IL-6*, *JAK2* i *STAT3*. Doktorant przedstawił wnikliwą analizę piśmiennictwa dotyczącego wzajemnego powiązania tych cząsteczek i ich udziału w szlakach sygnałowych w aspekcie indukcji metastazy i lekooporności. Interesujące są także wyniki analizy korelacji pomiędzy oznaczanymi parametrami. Zdaniem Doktoranta wzajemne zależności pomiędzy adipokinami i cytokinami wskazują na wielowymiarowy efekt działania cisplatyny na komórki linii Ishikawa. Dyskusję wieńczy podsumowanie, w którym Doktorant wskazuje na znaczącą rolę mikrośrodowiska guza, które w tym eksperymencie, z racji zastosowanego modelu badawczego, nie mogło być

zbadane. Zatem w końcowym zdaniu wskazuje na konieczność kontynuacji przedstawionych badań.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant przedstawił pięć wniosków, które są zgodne z celem pracy i stanowią o przeprowadzeniu badań, które pozwoliły na weryfikację hipotez badawczych. Jedyne zastrzeżenie budzi wniosek nr 3, w którym Doktorant sugeruje udział cząsteczek miRNA w regulacji ekspresji TNF- α pomijając aspekt występowania tej cytokiny w formie błonowej.

Podsumowując, rozprawa doktorska lek. Roberta Kiełbasińskiego stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Rzetelność i konsekwencja w realizacji eksperymentu świadczą o umiejętności samodzielnego prowadzenia badań. Poszczególne rozdziały konsekwentnie prowadzą do kolejnych części dysertacji i składają się na spójną i logiczną całość, a złożona i wieloaspektowa interpretacja uzyskanych wyników świadczy o szerokiej wiedzy w zakresie realizowanego tematu. Przedstawione uwagi i sugestie nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji, która niewątpliwie posiada wysokie walory naukowe.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lek. Roberta Kiełbasińskiego pt. *Zmiany wzorca ekspresji genów kodujących wybrane adipokiny i czynniki prozapalne w raku endometrium* spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 ze zm.), dlatego wnoszę do Wysockiej Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie lek. Roberta Kiełbasińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry Biologii Molekularnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach


dr hab. n. med. Joanna Gola, prof. SUM