



UMCS

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE
Wydział Biologii i Biotechnologii

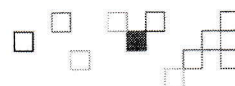
Dr hab. n. biol. Roman Paduch, prof. UMCS
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Biologii i Biotechnologii
Instytut Nauk Biologicznych
Katedra Wirusologii i Immunologii

Lublin, dn. 19.07.2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr inż. Konrada Kwaśniaka**
pt. "Rola wybranych długich niekodujących RNA w regulowaniu inwazyjności komórek
niedrobnokomórkowego raka płuca"
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Tabarkiewicza

Przestawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Konrada Kwaśniaka obejmuje badania z zakresu genetyki onkologicznej. Autor starał się określić rolę wybranych długich niekodujących RNA (lncRNA) w rozwoju oraz indukcji inwazyjności komórek niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC). Analizy wykonano na materiale pobranym z guzów nowotworowych zdiagnozowanych pacjentów oraz w klasycznych hodowlach komórkowych *in vitro*. Badania zostały oparte o szereg metod eksperymentalnych w tym reakcji Real Time PCR, elektroforetycznych metod analiz białka, metod cytometrycznych, immunoenzymatycznych jak również analiz przeprowadzonych *in silico*.

Niedrobnokomórkowy rak płuca stanowi obecnie jeden z najczęściej diagnozowanych nowotworów w Polsce. Niestety, w dużej mierze rozpoznawany jest w zaawansowanym stadium rozwoju co znacząco utrudnia leczenie bazujące na standardowych schematach terapeutycznych.



Jest to choroba związana z niekontrolowanym rozrostem komórek nowotworowych w tkance płuca prowadzącym do rozwoju w niej stanu zapalnego, duszności, zakażeń układu oddechowego, a tym samym upośledzania wymiany gazowej w płucach. Obecnie stosowane są trzy metody leczenia tego nowotworu: chirurgiczna resekcja, radioterapia oraz chemioterapia. Są to metody skuteczne, jednak nadal należy poszukiwać takich schematów terapeutycznych, które charakteryzować się będą wysoką efektywnością, a przy tym ograniczonym zakresem skutków ubocznych. Ciekawą i zdobywającą coraz większą popularność potencjalną metodą diagnostyczną jest analiza funkcjonalnej roli lncRNA w przebiegu rozwoju raka w tym raka płuca jak również leczenia nowotworów. Wykazano, że ten duży fragment ludzkiego transkryptomu może odgrywać istotną rolę w progresji choroby jak i fizjologicznych procesach komórkowych. Wykazano, że lncRNA biorą udział w inicjacji procesu nowotworzenia nawet na etapie nowotworowej komórki macierzystej, promują przerzut komórek transformowanych jak również oporność na stosowane leczenie. Stąd też podkreśla się możliwość wykorzystania tej struktury jako potencjalnego celu terapeutycznego w leczeniu chorób nowotworowych. Prowadzenie badań w tym kierunku jest więc perspektywiczne, a terapie ukierunkowane na onkogenne lncRNA mogą stanowić obiecujące podejście medyczne w leczeniu nowotworów. Badania realizowane w ocenianej pracy doktorskiej w pełni wpisują się w ten trend. Prowadzenie prac badawczych w tej tematyce jest potrzebne i istotne nie tylko z punktu widzenia poszerzania wiedzy podstawowej, lecz również potencjalnego rozwoju nowych terapii w onkologii. Biorąc pod uwagę ważny naukowo, i potencjalnie praktyczny wymiar zaplanowanych badań uważam pojęcie tematu rozprawy doktorskiej za uzasadnione.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska napisana została w układzie klasycznym, charakterystycznym dla opracowań eksperymentalnych. Tekst jest napisany zrozumiale. Jednak Autor nie uniknął błędów literowych lub przestawień w wyrazach, które prowadzą do pojawienia się zupełnie innych określeń aniżeli planowane. Niemniej jednak przedstawione opisy stanowią spójną całość i dotyczą ściśle zagadnień zasygnalizowanych w tytule rozprawy.



Oceniana rozprawa doktorska jest utworem dość obszernym liczącym 164 strony, a zawarta w niej treść podzielona została na 11 podstawowych rozdziałów i wyróżnionych w ich obrębie podrozdziałów. Na uznanie zasługuje oprawa graficzna pracy licząca 56 rycin oraz 33 tabele. Ułatwiają one zrozumienia przekazywanych treści jak również obrazują opisywane przez Autora wyniki własne. W pracy umieszczony został wykaz skrótów ułatwiający poruszanie się w tekście, który w dużej mierze bazuje na opisie zagadnień genetycznych i immunologicznych w których skrótowce pojawiają się nader często.

Autor zamieścił w pracy streszczenie w języku polskim oraz angielskim. Prezentuje ono w zwięzłej formie założenia rozprawy, wyniki badań oraz wnioski wynikające z opracowania uzyskanych wyników. Ta krótka forma przekazu podstawowych założeń pracy napisana jest poprawnie, umożliwiając zapoznanie się z podjętymi problemami badawczymi.

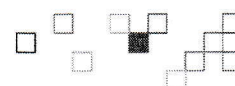
Wstęp pracy stanowi zwięzłe napisany tekst prezentujący podstawy teoretyczne analizowanych zagadnień. Autor przedstawił problematykę związaną z rozwojem niedrobnokomórkowego raka płuca oraz roli lncRNA w patogenezie tej choroby. Ponadto wskazane i scharakteryzowane zostały podstawowe czynniki związane z regulacją rozwoju i przerzutu nowotworów złośliwych. Chciałbym w tym miejscu wskazać jednak na zbyt dużą dowolność i zmiennosć w stosowaniu przez Autora określeń typu odporność i oporność. Odporność powinno się przedstawiać w kontekście zdolności np. organizmu do biernej lub czynnej ochrony przed antygenem lub inną formą niekorzystnego wpływu na homeostazę. Z kolei, oporność należy definiować jako brak wrażliwości np. patogenów na działanie skierowanych przeciwko nim czynników chemicznych, fizycznych lub biologicznych. Chciałbym również zwrócić uwagę na nieścisłość zapisu: „Obecność EpCAM na błonie krążących komórek ...” Częsteczką EpCAM jest transmembranowa glikoproteina z krótką domeną wewnątrzkomórkową. Wskazaniem byłoby więc zapisać: Obecność EpCAM w błonie krążących komórek. Pomimo tych drobnych uwag, uważam że rozdział ten zawiera wyjaśnienie wszystkich niezbędnych zagadnień pomocnych w zrozumieniu założeń pracy i celowości prowadzenia tego typu badań.



Cel pracy został sformułowany bardzo jasno. Autor prezentuje również cele pośrednie mające za zadanie prowadzenie dalszej wnikliwszej analizy roli badanych czynników w rozwoju raka płuca. Przedstawiony cel badań jest realny do wykonania w oparciu o wskazane w kolejnym paragrafie metody doświadczalne i w pełni oparty na przesłankach naukowych.

W rozdziale materiały i metody Doktorant dokładnie opisuje metodologię badań i swój warsztat technik eksperymentalnych, pomocnych w przeprowadzeniu analiz zmierzających do udowodnienia postawionej hipotezy badawczej. Przedstawiony został dość bogaty panel różnych metod doświadczalnych obejmujących techniki genetyczne i immunologiczne. Opis metod jest poprawny i pozwalający na ich odtworzenie w innych ośrodkach. Zaproponowany zakres eksperymentów jest wystarczający do realizacji celów pracy. Dobór testów statystycznych wykorzystanych do analizy uzyskanych wyników nie budzi zastrzeżeń. Ciekawym elementem pracy jest wykonanie badań z wykorzystaniem materiału pobranego od pacjentów jak również prowadzenie badań *in vitro* z użyciem komercyjnie dostępnych linii komórkowych. Ponadto schemat koncepcji badawczej i kolejności wykonywanych doświadczeń jest bardzo pomocny w objęciu całości założeń stanowiących hipotezę badawczą. W paragrafie 3.14 chciałbym jednak zwrócić uwagę na kolejną nieścisłość. Autor pisze, że analiza wykonana została przy pomocy odwróconego mikroskopu świetlnego. Przypuszczam, że chodziło o mikroskop odwróconego pola.

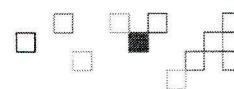
W rozdziale wyniki Doktorant bardzo skrupulatnie opisał efekty przeprowadzonych przez siebie badań. Zostały one przedstawione w formie opisowej, klarownych wykresów, zdjęć jak również zestawione w tabelach. Są one czytelne, a przez to łatwe do analizy. Wykonując analizę zdolności inwazyjnych komórek nowotworowych uważam, że miarodajne wyniki dałaby również analiza zdolności migracyjnych komórek wykonana w modelu Transwell migration. Uzyskane dane ewentualnie mogłyby dodatkowo potwierdzić wyniki uzyskane w teście rysy. W rozdziale tym Autor ponownie dowolnie używa tym razem różnych form zapisu czynnika NF- κ B. Mimo, że oznaczają one to samo, należałoby się trzymać stylu zapisu zasugerowanego w wykazie skrótów. Przygotowując pracę do publikacji należy zwrócić szczególną uwagę na



stosowanie ujednoliconych form zapisu skrótowców. Niemniej jednak, mimo tych sugestii uważam, że cel pracy został zrealizowany. Uzyskane wyniki stanowią cenne źródło danych umożliwiające realne rozważanie ich potencjalnego praktycznego wykorzystania.

Rozdział dyskusja jest bardzo obszerny i stanowi bardzo ciekawe studium łączące zmiany genetyczne obejmujące lncRNA z procesami immunologicznymi a w konsekwencji agresywnością nowotworu. Wyjaśnione zostały wyniki własne na tle doniesień w dostępnej literaturze światowej. Przeprowadzona w dyskusji interpretacja uzyskanych wyników nie budzi zastrzeżeń. W mojej opinii przeprowadzona analiza prawidłowo i obiektywnie wyjaśnia obserwacje eksperymentalne potwierdzając tym samym prawidłowość i zasadność stawianej hipotezy badawczej.

Autor rozprawy zaproponował 9 wniosków na podstawie własnych badań. Są one ściśle związane z uzyskanymi wynikami. Zabrakło mi jednak ogólnych wniosków odnoszących się nie do konkretnych wyników, lecz podsumowujących jako całość przeprowadzone badania. Stąd też proszę Autora o ocenę jakie potencjalne znaczenie kliniczne mogą mieć otrzymane wyniki? Który z badanych lncRNA może stanowić cel działań terapeutycznych umożliwiając uzyskanie pozytywnych wyników w ewentualnym leczeniu? Ponadto czy konstruowanie terapii opartych na modulowaniu ekspresji określonych lncRNA może znaleźć szersze zastosowanie, ograniczając niektóre obecnie stosowane przeciwnowotworowe metody terapeutyczne cechujące się nie zawsze oczekiwaną skutecznością? Jak zdaniem Autora może wyglądać różnica w wyrażeniu badanych lncRNA w nowotworowych komórkach zejściowych i macierzystych nowotworu? Proszę również wskazać, jak zdaniem Autora regulowanie ekspresji lncRNA w komórkach nowotworowych może wpływać na jego wyrażenie i zmiany w komórkach prawidłowych lub komórkach mikrośrodowiska nowotworu? Czy może warto również sprawdzić konsekwencję zmian ekspresji określonych lncRNA w komórkach mikrośrodowiska nowotworu na proliferację i zdolności migracyjne komórek transformowanych nowotworowo?



Piśmiennictwo obejmuje 184 pozycje, dobrane prawidłowo. Są to badania opublikowane w materiałach o zasięgu międzynarodowym. Pozycje literatury są aktualne i dobrane konkretnie do badań podjętych w rozprawie doktorskiej.

Podsumowując, stwierdzam że Doktorant w pełni wypełnił i odpowiedział na pytania badawcze postawione w celu pracy. Przedstawione zostały konsekwencje modulowania określonych lncRNA i ich wpływ na cząsteczki istotne z punktu widzenia rozwoju i rozprzestrzeniania się nowotworu. Zaplanowane analizy zostały wykonane prawidłowo z wykorzystaniem nowoczesnych metod eksperymentalnych. Wyniki zostały opracowane starannie i odpowiednio zinterpretowane. Przeprowadzone badania stanowią więc ciekawy przyczynek do dyskusji na temat szerszego wykorzystania lncRNA w terapii przeciwnowotworowej. Jest to mocna strona ocenianej dysertacji.

Rozprawa doktorska mgr inż. Konrada Kwaśniaka jest więc opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą dla dysertacji doktorskich.

W zawiązku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego wniosek o dopuszczenie mgr inż. Konrada Kwaśniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto z uwagi na szeroki zakres przeprowadzonych badań, staranne wykonanie i opracowanie wyników, które mogą mieć potencjalny praktyczny wymiar wnosząc do wysokiej Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Kierownik Katedry

Dr hab. Roman Paduch, prof. UMCS
Roman Paduch

