Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Kierownik: Prof. dr hab. med. Jacek Nikliński
15-269 Białystok, u. Waszyngtona 13
Tel. (+48)85 748 59 35; Fax: (+48)85 748 59 88

OCENA

rozprawy doktorskiej na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki o zdrowiu mgr Moniki Wrzosek pt. „Rola przysadkowych hormonów płciowych w patogenezie i progresji raka płuca"

Rak płuca jest najczęściej występującym nowotworem w populacji ludzkiej i odpowiadał za 18.4% wszystkich zgonów z powodu raka (łącznie u kobiet i mężczyzn) w 2018 roku na całym świecie.

W Polsce notuje się około 20 tysięcy nowych zachorowań rocznie z tendencją wzrostową obserwowaną w przeciągu ostatnich lat. Jednocześnie, jak wynika z danych epidemiologicznych naszego kraju, odsetek chorych wyleczonych z powodu raka płuca pozostaje od lat na bardzo niskim poziomie i wynosi zaledwie około 5%.

Szczególnie interesującym zagadnieniem są różnice płciowe w ryzyku rozwoju raka płuca z obserwowanym wzrostem częstości występowania tego nowotworu wśród kobiet. Z jednej strony wskazuje się większą podatność kobiet na działanie czynników rakotwórczych zawartych w tytoniu i dymie tytoniowym ze względu na różnice hormonalne, genetyczne i metaboliczne w porównaniu z mężczyznami, a z drugiej podkreśla się znaczenie zaburzeń endokrynologicznych w rozwoju raka płuca u obu płci. Interesującym zagadnieniem jest rola osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej w regulacji odpowiedzi immunologicznej w powiązaniu z rozwojem i progresją nowotworową. Poznanie mechanizmów działania i wieloczynnikowych interakcji hormonów płciowych w procesach regulacji angiogenezy, migracji i przerzutów komórek raka płuca, jak również interakcji ze szlakami sygnałowymi w komórkach raka płuc może dostarczyć istotnych informacji dla badań nad koncepcją skojarzonej terapii hormonalnej, immunoterapii i terapii ukierunkowanej molekularnie.

Dlatego też uważam, że tematyka przedłożonej mi do recenzji pracy dotycząca oceny przysadkowych hormonów płciowych w patogenezie i progresji nowotworów płuc jest istotna

z badawczego punktu widzenia i w pełni uzasadniona w perspektywie wielowątkowych badań klinicznych.

Rozprawa obejmuje 123 strony, zawiera 10 tabel i 30 rycin. Autorka korzystała ze 132 pozycji piśmiennictwa z uwzględnieniem literatury polskiej i międzynarodowej. Praca została podzielona na 8 rozdziałów oraz szereg podrozdziałów.

Wstępna część rozprawy obejmuje krótkie wprowadzenie w zakresie epidemiologii i kliniki raka płuca oraz opis struktury i funkcji hormonów wydzielanych przez przysadkę mózgową oraz ich rolę w patogenezie nowotworów. Ponadto Autorka dokładne przedstawiła udział i znaczenie krótkich niekodujących cząstek RNA (microRNA) w rozwoju raka płuca oraz ich potencjalnego znaczenia w terapii celowanej.

Szczegółowy i klarowny opis oraz przejrzystość i czytelność przedstawionych przez Autorkę rycin, schematów i tabel podsumowujących poszczególne zagadnienia poruszane we wstępie rozprawy doktorskiej, świadczy o dużej wiedzy Autorki z zakresu biologii komórki i molekularnych podstaw nowotworów oraz wskazuje na umiejętności wybiórczej selekcji najważniejszych informacji i sposobie ich prezentacji.
Doktorantka zaplanowała ponadto analizę molekularną profili miRNA w surowicy krwi chorych na raka płuca.

Pani Monika Wrzosek podjęła się ocenić rolę hormonów przysadkowych FSH, LH i prolaktyny oraz ich receptorów w rozwoju raka płuca w oparciu o badania przeprowadzone na komórkach macierzystych płuc, liniach komórkowych nowotworu płuca i materiale klinicznym uzyskanym od chorych z rozpoznanym rakiem płuca.

Dla osiągnięcia tego celu Doktorantka zaplanowała i przeprowadziła:
a) ocenę potencjału migracyjnego prawidłowych komórek macierzystych płuc (AT2, BASC) do wybranych hormonów płciowych;

b) ocenę ekspresji receptorów FSH, LH, PRL w trójwymiarowym modelu płuc;

c) ocenę ekspresji receptorów dla FSH, LH, PRL w wybranych liniach komórkowych nowotworu płuca;

d) ocenę stężenia wybranych hormonów płciowych w surowicy krwi chorych na raka płuca;

e) ocenę ekspresji receptorów dla hormonów FSH, LH, PRL w tkankach zmienionych nowotworowo przy pomocy mikroskopu konfokalnego.

f) ocenę ekspresji krótkich niekodujących RNA (microRNA) w surowicy krwi chorych na raka płuca.

Materiałem badawczym były:

1. Komercyjne linie komórkowe niedrobnokomórkowego (NSCLC) i drobnokomórkowego (SCLC) raka płuca.
2. Hodowla populacji komórkowych izolowanych mysich pneumocytów II-rzędu (AT2) oraz oskrzelowo-pęcherzykowych komórek macierzystych płuc (BASC) w trójwymiarowym modelu płuc (organoidy).
3. Materiał kliniczny pozyskany od chorych z rakiem płuca (krew obwodowa, materiał pooperacyjny - tkanka guza płuca).

Doktorantka zastosowała szeroki wachlarz metod molekularno-genetycznych i histologicznych do realizacji postawionego celu badawczego, w tym metodę Real-Time PCR dla oceny ekspresji receptorów hormonów płciowych (FSH, LH i PRL) na poziomie RNA, Western-Blot dla oceny receptorów na poziomie białka, analizę cytometryczną i barwienie immunofluorescencyjne, metodę immunoenzymatyczną (ELISA) dla ocenę stężenia hormonów płciowych (FSH, LH, PRL) i metodę miRCURY LNA miRNA PCR do analizy ekspresji krótkich niekodujących RNA (microRNA).

Na podstawie uzyskanych wyników badań przeprowadzonych na hodowlach komórkowych Doktorantka wyciągnęła następujące wnioski:

1. Komórki macierzyste płuc AT2 i BASC wykazują ekspresję receptorów FSH, LH, PRL w trójwymiarowym modelu płuc. Komórki macierzyste płuc w trójwymiarowym modelu, w stanie spoczynku wykazują najwyższą ekspresję receptora PRL.

2. Hormony przysadkowe nie wpływają na potencjał proliferacyjny prawidłowych pneumocytów II-rzędu oraz oskrzelowo-pęcherzykowych komórek macierzystych.

3. Zdrowe komórki macierzyste płuc (AT2, BASC) wykazują aktywność chemotaktyczną wobec badanych przysadkowych hormonów płciowych. Komórki AT2 i BASC wykazują najwyższą aktywność chemotaktyczną do hormonu luteinizującego.

4. Badane linie raka płuca wykazują ekspresję receptorów FSH, LH i PRL, zarówno w stanie spoczynku jak również po stymulacji hormonalnej. Linia raka wielokomórkowego (HTB183) wykazuje najwyższą ekspresję receptora PRL, a linie płuca drobnokomórkowego (CRL 5853) oraz wielkokomórkowego (HTB 183) wykazują wysoką ekspresję receptora LH. Receptor FSH wykazuje najniższą ekspresję w badanych liniach komórkowych, co świadczy o braku wpływu tego receptora w patogenezie nowotworu płuca.

Z kolei na podstawie wyników badań FSH, LH i PRL na materiale klinicznym Doktorantka wyciągnęła następujące wnioski:

1. Guzy płuca wykazują ekspresję receptorów FSH, LH oraz PRL. 5.1. Wysoka ekspresja wszystkich badanych receptorów dla hormonów przysadkowych występuje w nowotworze płuca niedrobnokomórkowym typ gruczołowy oraz zapaleniu płuca.

2. W surowicy krwi chorych na raka płuca występują zmiany w stężeniu przysadkowych hormonów płciowych, uwzględniając podział na płeć oraz rodzaj histopatologiczny raka płuca. U mężczyzn dochodzi do wzrostu stężenia FSH niedrobnokomórkowym raku płuca, natomiast u kobiet następuje obniżenie stężenia tego hormonu zarówno w niedrobnokomórkowym (NSCLC) jak i drobnokomórkowym (SCLC) raku płuca. U mężczyzn zarówno z rakiem NSCLC jak i SCLC dochodzi do wzrostu stężenia hormonu luteinizującego w surowicy, u kobiet natomiast następuje obniżenie stężenia LH oraz PRL.

Procedury powyższych badań zostały opisane przez Doktorantkę w sposób bardzo szczegółowy, a sposób ich przeprowadzenia nie budzi żadnych zastrzeżeń. Autorka uwzględniła wszystkie niezbędne kontrole ujemne i dodatnie oraz kontrole wewnętrzne jak i zewnętrzne. Tak dokładnie opisane przez Autorkę metody badań niewątpliwie dają możliwość powtórzenia eksperymentu przez inne laboratoria. Możliwość odtworzenia procedury badania jest jednym z ważniejszych kryteriów kwalifikacji jakości przedkładanych prac. Wnioski wyciągnięte przez Autorkę są sformułowane precyzyjnie i odzwierciedlają uzyskane wyniki.

W kolejnej części pracy Doktorantka dokonała oceny profilu krążącego miRNA jako potencjalnego biomarkera raka płuca. Autorka przedstawiła wyniki ekspresji krążących miRNA, wyizolowanych z surowicy 6 pacjentek z gruczolakorakiem płuca, palących oraz od 3 kobiet zdrowych, palących zakwalifikowanych do grupy kontrolnej. Analizy przeprowadziła metodą miRCURY LNA miRNA PCR z wykorzystaniem płytek 96 dołkowych opłaszczonych liofilizowanymi starterami.

Autorka opisała poszczególne etapy analiz, w tym normalizację wyników między płytkami oraz normalizację ekspresji badanych miRNA względem genu referencyjnego miR-21-5p. Wykorzystała analizy wstępne takie jak PCA i heat-map do zobrazowania podobieństw i różnic między grupami badanymi i zaprezentował je w formie graficznej, dzieląc badane osoby na trzy grupy ze względu na poziomy ekspresji miRNA. Wyniki zostały poddane dwustronnemu t-testowi Studenta z przyjętymi kryteriami ważności statystycznej: fold change >2 oraz p-value < 0,05.

Autorka zidentyfikowała 40 miRNA o zmienionej ekspresji w gruczolakoraku płuca w stosunku do grupy kontrolnej i wraz z odpowiadającymi im danymi statystycznymi przedstawiła w tabeli. Wykazała, że przy założeniu poziomu istotności p-value < 0,05 różnica ekspresji tylko czterech cząsteczek była istotna statystycznie (miR-148b-3p; miR-15a-5p, miR-451a i miR-660-5p).

Badania profilu miRNA zostały przeprowadzone poprawnie zarówno pod względem metodologicznym jak i interpretacyjnym.

Zastosowana przez Doktorantkę metoda miRCURY LNA miRNA PCR do analizy ekspresji miRNA jest powszechnie stosowana i zapewnia wysoką czułość i specyficzność przeprowadzonych analiz. Technika ta umożliwia oznaczanie ilościowe miRNA wyizolowanych z trudnych próbek takich jak mikroskrawki pozyskane techniką mikrodyssekcji laserowej oraz wolne, krążące RNA, w surowicy lub osoczu.

Niemniej jednak na podstawie analizy metodologicznej i interpretacyjnej przedstawiam uwagi i sugestie, które Autorka może wykorzystać zarówno przy planowaniu kolejnych badań nad krótkimi, niekodującymi cząstkami RNA jak i przygotowaniu pracy do druku:

1. Biorąc pod uwagę, iż materiałem biologicznym z którego izolowano RNA, niezbędna jest informacja odnośnie oceny hemolizy - czy i w jaki sposób była oceniana. Takiej informacji w niniejszej pracy zabrakło. Ocena hemolizy jest etapem kluczowym ponieważ podczas tego procesu dochodzi do uwolnienia miRNA znajdujących się w erytrocytach, co może w znaczny sposób zaburzyć wiarygodność uzyskanych wyników.

2. Niewielka liczebność grupy badanej (6 pacjentek) oraz kontrolnej (3 kobiety) nie pozwala na uzyskanie odpowiedniej mocy testu statystycznego. Widoczne jest to w grupowaniu pacjentów przedstawionych na mapie termicznej i wykresie PCA, gdzie w grupie 2 i 3 znajdują się zarówno pacjentki chore, jak i kobiety zdrowe, natomiast grupę 1 stanowi tylko jeden pacjent. W przypadku większej liczebności grupy badanej taki pacjent mógłby zostać wykluczony z analiz jako prezentujący wartości odstające. Przed przygotowaniem pracy do druku rekomenduję wykonanie badań poziomu ekspresji miRNA na dodatkowej grupie pacjentek w celu zwiększenia mocy statystycznej i potwierdzenia poprawności uzyskanych wyników.

3. Autorka nie wykazuje spójności co do wartości p-value. W tekście pracy jest informacja o p-value < 0,05, podczas gdy w tabeli pojawiła się dodatkowo p-value < 0,1 bez podania wyjaśnienia co do zasadności jego użycia.

4. Informacje dotyczące normalizacji przeprowadzonej względem genu referencyjnego nie są wystarczająco wyjaśnione w tekście. Ponadto Rycina 27 jest niejasna i trudna do interpretacji min. ze względu na brak szczegółowej legendy wyjaśniającej chociażby co oznacza pojęcie „gęstości" umieszczonej na osi Y.

W rozdziale „Dyskusja" Autorka potrafiła właściwie ustosunkować się do uzyskanych wyników i bardzo umiejętnie oraz wyczerpująco przeprowadziła dyskusję z wynikami uzyskanymi przez innych autorów.

Reasumując, rozprawa doktorska mgr Moniki Wrzosek pt. „Rola przysadkowych hormonów płciowych w patogenezie i progresji raka płuca" stanowi ważny wkład do badań nad biologią raka płuca."

Doktorantka posiada szerokie umiejętności praktycznego posługiwania się zaawansowanymi metodami molekularnymi, w tym metodami hodowli komórkowej. Posiada również umiejętności przejrzystego i precyzyjnego opisania metod badawczych, właściwej

interpretacji wyników i trafnego wyciągania wniosków. Świadczy to o wysokich umiejętnościach badawczych Doktorantki oraz możliwości samodzielnego prowadzenia prac naukowych, a wiedza i zrozumienie skomplikowanych procesów biologicznych umożliwia kontynuowanie Jej dalszego rozwoju naukowego.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk o Zdrowiu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Moniki Wrzosek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Przedkładam jednocześnie wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

KIEROWNIK
Zakładu Klinicznej Biologii Molekularnej
prof. dr hab. Jacek Nikliński

Białystok, 29.05.2023

Prof. dr hab. Jacek Nikliński