



**KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII
I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE**

20-093 Lublin, ul. dr W. Chodźki 1
tel. fax 48 (81) 742-37-93

Lublin, 18.10.2021

Ocena rozprawy doktorskiej mgr **Alicji Głuszko** pt. **„Rola egzosomów i angiogenezy indukowanej hipoksją w rakach płaskonabłonkowych regionu głowy i szyi u człowieka”**

Choroby nowotworowe są wyzwaniem współczesnej medycyny. Mimo ogromnego postępu, w niektórych typach nowotworów leczenie nie przynosi oczekiwanych, dobrych rezultatów. Jedną z takich grup nowotworów są nowotwory regionu głowy i szyi (HNC), które choć nie charakteryzują się zbyt podstępny i skrytym przebiegiem, to jednak ich wykrywanie w dalszym ciągu jest opóźnione, co znacząco ogranicza sukces leczenia i drastycznie skraca czas przeżycia chorych. W odróżnieniu od innych typów nowotworów leczenie HNC, a zwłaszcza dominującego w tej okolicy raka płaskonabłonkowego (HNSCC), nie zmieniło się zasadniczo od ponad 30 lat. Próby terapii celowanych, skierowanych np. przeciwko EGFR, nie przyniosły sukcesu pomimo znaczącej nadekspresji tego receptora w HNSCC. Dlatego podejmowanie działań dotyczących określenia nowych celów terapeutycznych w HNSCC jest bardzo istotne.

W ten nurt badań wpisuje się przedłożona do oceny rozprawa Pani **Alicji Głuszko**. Stanowi ona raport z badań Autorki dotyczących potencjalnej roli egzosomów oraz białka CD44 w angiogenezie HNC.

Wyniki rozprawy doktorskiej w postaci dwóch oryginalnych prac naukowych zostały opublikowane w latach 2019 i 2021 w uznanych czasopismach międzynarodowych (Cancers, Cancer Letters) z wysokim IF. Całość, dodając do tego publikację pogładową, osiągnęła imponujący jak na ten etap kariery naukowej IF równy 16,275. Zdarza się, że osiągnięcia naukowe w przewodach habilitacyjnych mają mniejszą wagę punktową IF niż oceniana praca doktorska. Doktorantka jest pierwszym Autorem dwóch prac (oryginalnej i pogładowej) oraz trzecim Autorem w jednej pracy oryginalnej, co świadczy o jej znaczącym wkładzie w ich

wykonanie i przygotowanie do publikacji. Wraz z rozprawą zostały przesłane wymagane oświadczenia, a wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie omawianych publikacji w pracy doktorskiej, określając w procentach swój w nich udział. Na uwagę zasługuje opis udziału pracy poszczególnych Autorów w publikacji w *Cancers*, z którego wynika, że Doktorantka wykonała całość części doświadczalnej. Brak takiego opisu w publikacji w *Cancer Letters* uniemożliwia ocenę, które elementy tej pracy oryginalnej Doktorantka wykonała samodzielnie i w związku z tym jakimi dodatkowymi możliwościami eksperymentalnymi dysponuje.

Rozprawa o niezbyt typowym układzie dla prac doktorskich liczy 79 stron i została podzielona na 5 zasadniczych rozdziałów: **Wstęp, Hipoteza Badawcza, Cele pracy, Kopie Opublikowanych Prac, Podsumowanie i Wnioski** oraz wspólne dla nich piśmiennictwo. Rozprawa zawiera również streszczenia pracy w języku polskim i angielskim (określone jako Abstract), została wzbogacona o wykaz używanych skrótów i symboli stanowiące użyteczny dla czytelnika odnośnik do tekstu. Brakuje mi chociaż krótkiego zestawienia metod badawczych, określanych zwykle jako „Metody”, jednoznacznie wyodrębnionych „Wyników” oraz „Wniosków” zamiast podrozdziału „**Podsumowanie i Wnioski**” oraz klasycznej „Dyskusji”. Co prawda, elementy te znalazły się oczywiście w pracach oryginalnych, tym niemniej moim zdaniem korzystna dla całościowego obrazu rozprawy byłaby zbiorcza synteza obu prac oryginalnych. Rozprawa zawiera również pracę poglądową omawiającą funkcję egzosomów i ich potencjalną rolę w onkogenezie. W rozprawie zamieszczono przedruki prac będących podstawą rozprawy:

1. [Small Extracellular Vesicles from Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells Carry a Proteomic Signature for Tumor Hypoxia.](#) **Gluszko A**, Szczepański MJ, Whiteside TL, Reichert TE, Siewiera J, Ludwig N. *Cancers (Basel)*. 2021 Aug 19;13(16):4176. doi: 10.3390/cancers13164176
2. [Exosomes in Cancer: Circulating Immune-Related Biomarkers.](#) **Gluszko A**, Szczepański MJ, Ludwig N, Mirza SM, Olejarz W. *Biomed Res Int*. 2019 Dec 11;2019:1628029. doi: 10.1155/2019/1628029. eCollection 2019.
3. [CD44\(+\) tumor cells promote early angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma.](#) Ludwig N, Szczepanski MJ, **Gluszko A**, Szafarowski T, Azambuja JH, Dolg L, Gellrich NC, Kampmann A, Whiteside TL, Zimmerer RM. *Cancer Lett*. 2019 Dec 28;467:85-95. doi: 10.1016/j.canlet.2019.10.010. Epub 2019 Oct 5.

Krótki **Wstęp** zawarty na stronach 14-20 zaczyna się wprowadzeniem w zagadnienia dotyczące istoty rozprawy. Rozdział ten rozpoczyna się opisem epidemiologii i etiologii raka płaskonabłonkowego regionu głowy i szyi, zwracając uwagę na czynniki infekcyjne i środowiskowe. Doktorantka pisze też pokrótce o roli bliżej niesprecyzowanych czynników

genetycznych i epigenetycznych, które mogą stanowić podłoże choroby, nie dokonuje jednak nawet pobieżnej ich charakterystyki. Wspomina też o roli czynników wzrostu w progresji guza. Następny, w mojej ocenie kluczowy podrozdział „Wstępu”: **Rola angiogenezy i hipoksji w progresji i przerzutowaniu**, Autorka rozprawy traktuje równie zdawkowo jak poprzednie - zajmuje on 18 wersów, podaje bardzo ogólne informacje typu: „HNSCC cechuje mnogość wydzielanych cytokin będących promotorami naczyniotworzenia i jednocześnie heterogenność angiogenna w ich sekrecji.”

Zdecydowanie więcej informacji znajduje się w drugiej części „**Wstępu**” dotyczącej egzosomów. Doktorantka opisuje ich powstawanie, homeostazę oraz potencjalną rolę w nowotworach ludzkich ze szczególnym uwzględnieniem angiogenezy i hipoksji. Zagadnienie to zostało znacznie rozwinięte w pracy poglądowej wchodzącej w skład cyklu, która bardzo dobrze wprowadza czytelnika w część doświadczalną pracy oryginalnej opublikowanej w *Cancers*.

Brakuje mi natomiast opisu budowy i funkcji receptora kwasu hialuronowego – glikoproteiny powierzchniowej CD44.

Cele badawcze pracy sformułowane są krótko i przejrzysto.

Przechodząc do oceny wyników w pracach oryginalnych – obydwa artykuły ukazały się w prestiżowych czasopismach naukowych - *Cancers* i *Cancer Letters* o wysokim współczynniku wpływu IF, co już samo z siebie świadczy o istotności podejmowanych w nich zagadnień i jakości przeprowadzonych badań.

Należy zwrócić uwagę na przemyślany dobór metod badawczych i modeli eksperymentalnych, szczególnie w zakresie badań *in vivo* – zastosowania modelu imitującego onkogenezę raka jamy ustnej u myszy. Metodyka opublikowanych prac jest obszerna, obejmuje typowe doświadczenia typu „wet lab” – zarówno preparatywne, jak i zaawansowane analizy mikroskopowe oraz spektrometrię mas, co w połączeniu z analizą bioinformatyczną spełnia wymogi nowoczesności wymagane w badaniach z tego zakresu. Analiza statystyczna nie budzi zastrzeżeń. Przyjęte testy statystyczne nie odbiegają od standardów światowych, a ich wybór należy uznać za odpowiedni.

Celem pracy oryginalnej opublikowanej w *Cancers* było ustalenie wpływu hipoksji na zmiany ilościowe oraz jakościowe egzosomów pochodzenia nowotworowego powiązane z oceną stopnia odzwierciedlenia statusu oksygenacji komórki rodzicielskiej przez proteom wydzielanych przez nią egzosomów. Z zadania tego Doktorantka wywiązała się wzorowo. Pewien niedosyt może budzić jedynie model badawczy użyty do przeprowadzenia badań – stabilne linie komórkowe w warunkach *in vitro* pasażowane przez wiele lat na plastikowych powierzchniach nie mają kontaktu z macierzą pozakomórkową czy mikrośrodowiskiem guza. Dlatego też linie te dość często mogą tracić zdolność do ekspresji

niektórych białek związanych z angiogenezą, która nie zachodzi w takim środowisku doświadczalnym. Moim zdaniem bardziej odpowiednim do tego celu modelem byłyby hodowle o typie organoidów. Tym niemniej uzyskane doświadczenie badawcze przez Doktorantkę ułatwi jej niewątpliwie przeprowadzenie tego typu lub podobnych eksperymentów w innych modelach w przyszłości.

Druga z prac oryginalnych opublikowana w Cancer Letters nie budzi zastrzeżeń i świadczy również o umiejętności pracy Doktorantki w międzynarodowym zespole badawczym. Uwagę zwraca pokrywanie się niektórych wyników eksperymentalnych w modelu zwierzęcym z wynikami uzyskanymi u pacjentów, co stanowi element badań translacyjnych i świadczy o przemyślanej strategii badawczej.

Dyskusja przedstawionej do recenzji dysertacji jest zawarta w oryginalnych publikacjach w języku angielskim. Świadczy ona o swobodnym poruszaniu się Autorki w zagadnieniu będącym przedmiotem rozprawy doktorskiej. Zawarte w dyskusji informacje w sposób rzeczowy i wiarygodny porównują uzyskanie wyniki z danymi zaczerpniętymi z piśmiennictwa. Doktorantka formułuje ciekawe hipotezy, popierając je wynikami badań własnych oraz dostępnych w piśmiennictwie. Pewien niedosyt może budzić fakt braku dyskusji zintegrowanych wyników z 2 prac oryginalnych stanowiących rozprawę doktorską. Uważam, że rozwinięcie zamieszczonego przez Doktorantkę rozdziału **Podsumowanie i Wnioski** byłoby dobrym rozwiązaniem.

Jako **Wnioski** należałoby chyba potraktować ostatnie zdania z wyżej przytoczonego rozdziału rozprawy, cytując: „Wnioski płynące z pracy potwierdzają (1?) istotną rolę egzosomów w nowotworzeniu, a także wpływ hipoksji na promowanie neoangiogenezy z udziałem egzosomów i macierzystych komórek nowotworowych CD44(+). (2?) Translacja zebranych danych na płaszczyznę kliniczną potencjalnie przyniesie korzyść w określeniu heterogenności hipoksyjnej wnętrza guza oraz odpowiedzi na terapię, a także umożliwi zastosowanie nowych celowanych terapii antyproliferacyjnych”. Jeśli tak to przyjąć, to dwa? powyższe wnioski zostały sformułowane w odniesieniu do całości pracy, wynikają z konstrukcji badania, są ostrożne i uzasadnione.

Piśmiennictwo zawierające 126 pozycji jest adekwatne i świadczy o umiejętności selekcjonowania istotnych informacji związanych z podjętym tematem badań. Umieszczone pozycje piśmiennictwa są aktualne i znajdują się w bazach danych czasopism naukowych. Zdecydowana większość pozycji pochodzi z ostatnich 5 lat.

Konkludując stwierdzam, że przedmiot prowadzonych badań, dobór metod, prezentacja wyników, rzeczowość dyskusji oraz uzyskane wnioski odpowiadają kryteriom stawianym pracom doktorskim określone Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki w aktualnie obowiązującym brzmieniu.

W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Warszawie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Alicji Głuszko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na wartość uzyskanych wyników wnoszę o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Stepulak', written in a cursive style.

Andrzej Stepulak