

Warszawa dnia, 04.11.2021 r.

Dr hab. n. med. Elżbieta Sarnowska, prof. Instytutu  
Zakład Immunoterapii Eksperymentalnej

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

**Promotor: dr hab. n. med. Mirosław Szczepański**  
Katedra i Zakład Biochemii  
Wydział Lekarski  
Warszawski Uniwersytet Medyczny

**Wprowadzenie do recenzji**

Choroby nowotworowe są obecnie poważnym problemem opieki zdrowotnej i stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie, dlatego stanowią one istotny problemem cywilizacyjny. Współcześnie istnieje wiele nowoczesnych terapii pozwalających skutecznie leczyć chorobę nowotworową jednak, mają one wiele ograniczeń i nie zawsze przynoszą oczekiwane rezultaty. W związku z tym, badania pozwalające na zrozumienie mechanizmów prowadzących do powstania nowotworów, ucieczki spod kontroli układu immunologicznego, progresji oraz wpływu komórek nowotworowych na mikrośrodowisko guza pomogą skutecznie leczyć chorobę nowotworową na wielu płaszczyznach np. poprzez podanie terapii celowanej w komórki nowotworowe z jednoczesną modulacją odpowiedzi układu odpornościowego przeciwko nowotworowi. W ciągu ostatnich lat nastąpił wymierny postęp w leczeniu niektórych nowotworów np. w leczeniu czerniaka, jednak wciąż brakuje nowoczesnych terapii



w płaskonabłonkowym raku regionu głowy i szyi. Ten typ nowotworu klasyfikuje się na 7 miejscu jeśli chodzi o zapadalność na nowotwory złośliwe na świecie, natomiast szacuje się, że ilość przypadków wzrośnie o około 30% do 2030 roku. Przyczyn zachorowalności na płaskonabłonkowego raka regionu głowy i szyi jest wiele m. in. palenie tytoniu, spożywanie wysokoprocentowych alkoholi jak również (zwłaszcza w młodszej grupie wiekowej) zakażenie HPV związane ze zmianami w zachowaniach seksualnych. Pomimo różnic molekularnych w HNSCC HPV(+) i HPV(-) hipoksja jest ich cechą wspólną. Dodatkowo, w ostatnich latach coraz większą uwagę zwrócono na egzosomy, małe pęcherzyki wydzielane przez różnego rodzaju komórki w tym komórki nowotworowe. Jak się okazuje, komórki są w stanie „komunikować się” między sobą właśnie poprzez egzosomy. Poznanie funkcji egzosomów w procesach powstawania i rozwoju nowotworu niewątpliwie pomoże w zrozumieniu mechanizmów molekularnych oraz przyczyni się do rozwoju nowoczesnych terapii.

**Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Alicji Gluszko pt. „Rola egzosomów i angiogenezy indukowanej hipoksją w rakach płaskonabłonkowych regionu głowy i szyi u człowieka” doskonale wpisuje się we współczesny nurt badań naukowych i pozwoli na rozszerzenie wiedzy na poziomie badań podstawowych jak również aplikacyjnych.**

### **Omówienie rozprawy**

Rozprawa doktorska zawiera omówienie trzech uzupełniających się prac opublikowanych w renomowanych międzynarodowych czasopismach:

*Ludwig N, Szczepanski MJ, Gluszko A, Szafarowski T, Azambuja JH, Dolg L, Gellrich NC, Kampmann A, Whiteside TL, Zimmerer RM. CD44(+) tumor cells promote early angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Lett. 2019 Dec 28;467:85-95. doi: 10.1016/j.canlet.2019.10.010. Epub 2019 Oct 5.*



*Głuszko A, Szczepański MJ, Whiteside TL, Reichert TE, Siewiera J, Ludwig N. Small Extracellular Vesicles from Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells Carry a Proteomic Signature for Tumor Hypoxia. Cancers (Basel). 2021 Aug 19;13(16):4176. doi: 10.3390/cancers13164176.*

*Głuszko A, Szczepański MJ, Ludwig N, Mirza SM, Olejarz W. Exosomes in Cancer: Circulating Immune-Related Biomarkers. Biomed Res Int. 2019 Dec 11;2019:1628029. doi: 10.1155/2019/1628029. eCollection 2019.*

Pierwsze dwie prace to prace oryginalne, natomiast trzecia to praca poglądowa. W dwóch pracach, jednej poglądowej i jednej oryginalnej Doktorantka jest pierwszym autorem. W drugiej pracy oryginalnej jest jednym z wiodących autorów. IF opublikowanych prac stanowiących cykl wynosi 16.275 oraz 350 pkt. MEiN. Przedstawiona praca doktorska ma układ typowy dla prac składających się z cyklu publikacji.

Przedstawiona praca składa się ze streszczenia (w języku polskim i angielskim), wstępu, hipotezy badawczej, celów, cyklu opublikowanych prac oraz podsumowania i wniosków. Dodatkowo praca zawiera pozostałe elementy (załączniki) niezbędne do jej oceny.

W streszczeniu, znakomicie zarysowano problem rozważany w pracy, a we wstępie, wyjaśniono główne zagadnienia podjęte w rozprawie. Następnie jasno postawiono hipotezę badawczą oraz sprecyzowano cele pracy, którymi było:

1. Przegląd dotychczasowej literatury na temat roli egzosomów i angiogenezy w nowotworach;
2. Ocena wpływu hipoksji na zmiany ilościowe oraz jakościowe egzosomów pochodzenia nowotworowego;
3. Ocena stopnia odzwierciedlenia statusu oksygenacji komórki rodzicielskiej przez proteom wydzielanych przez nią egzosomów;



4. Ocena potencjału proangiogennej subpopulacji macierzystych komórek nowotworowych HNSCC o fenotypie CD44(+).

Osobną część pracy stanowią: wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, załączone publikacje, oświadczenia współautorów oraz zgodę właściwej Komisji Bioetycznej. W pracy szczególną uwagę zwraca przejrzyste napisana część wprowadzająca stanowiąca wstęp pracy. Ponadto czytelnie przedstawione zostały wyniki oraz poprawnie sformułowane wnioski. Praca przedstawiona jest w sposób klarowny, i zawiera wystarczające informacje, które umożliwiają ocenę dokonań Doktorantki.

Ponadto, co należy szczególnie podkreślić, Doktorantka w sposób wyważony i umiejętny przedstawia swoje osiągnięcia oraz fakt, że podjęła się dosyć trudnego zadania a mianowicie zbadania ładunku białek znajdujących się w pęcherzykach wydzielanych przez komórki nowotworowe przy różnych stężeniach tlenu oraz weryfikacji, czy nowotworowe komórki o cechach macierzystości mają zdolność do promocji procesu neoangiogenezy. Praca spełnia wszelkie wymogi formalne i jest zgodna z art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dn. 30 października 2015 r., w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2015, poz. 1842).

Pomimo bardzo przejrzystego przedstawienia zagadnień w pracy Doktorantka nie ustrzegła się kilku błędów edytorskich i pewnych nieścisłości. Doktorantka stwierdza, że „genomika czy transkryptomika nie uwzględnia zmian w ekspresji genu, modyfikacji potranslacyjnych, epigenetycznych czy obecności niekodującego RNA” (pisownia oryginalna). **Proszę o wyjaśnienie zagadnienia transkryptomiki i dlaczego Doktorantka twierdzi, że**



**transkryptomika nie uwzględnia zmian w ekspresji genu oraz obecności niekodującego RNA?**

W pracy zatytułowanej „*Small Extracellular Vesicles from Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells Carry a Proteomic Signature for Tumor Hypoxia.*” Doktorantka zidentyfikowała w egzosomach pochodzących z 3 linii HNSCC oraz zdrowej linii keratynocytów 7 białek charakterystycznych dla hipoksji z czego tylko 4 były unikalne dla komórek nowotworowych w tym KT33B. Dalej Doktorantka badała jakie białka są prezentowane w egzosomach pochodzących od komórek nowotworowych w różnych warunkach hipoksji, było ich 10, z czego tylko dwa się powtórzyły STONE2 i KT33B.

**Dlaczego tylko te białka zostały powtórnie zidentyfikowane, czy Doktorantka może to wyjaśnić?**

Białko KT33B było obecne tylko w warunkach hipoksji w egzosomach wydzielanych przez komórki nowotworowe. Czy jego ilość się zwiększała w warunkach wysokiej hipoksji (1% O<sub>2</sub>)? **Jeśli to białko charakterystyczne dla hipoksji, to czy nie powinno go być najwięcej w egzosomach wydzielanych przez komórki nowotworowe w warunkach największej hipoksji? Czy jest ono charakterystyczne tylko dla niewielkiej hipoksji?**

W analizach wielkoskalowych Doktorantka wykazała, że w egzosomach pochodzących z komórek nowotworowych w obniżonym stężeniu tlenu znajdują się białka odpowiadające za migrację komórek układu odpornościowego. **Czy Doktorantka może wyjaśnić to zjawisko?**

**Czy to może wpływać na modulację immuno mikrośrodowiska guza?**

**W jaki sposób Doktorantka mogłaby wykorzystać swoje odkrycia w diagnostyce opartej o biopsję płynną u pacjentów z płaskonabłonkowym rakiem regionu głowy i szyi?**

W drugiej pracy Doktorantka wykazała bezpośredni wpływ glikoproteiny CD44 na indukcję angiogenezy w komórkach HNSCC. Brakuje mi jednak w podsumowaniu połączenia tego



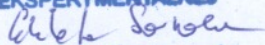
fenomenu z opisywanymi wcześniej egzosomami. **Czy Doktorantka badała czy ma zamiar badać egzosomy wydzielane przez komórki nowotworowe HNSCC z wysoką ekspresją CD44? Czy w swoich analizach Doktorantka zidentyfikowała glikoproteinę CD44 w egzosomach wydzielanych w różnych warunkach hipoksji, czy było to zależne od stężenia tlenu?** Dodatkowo, ekspresja CD44 silnie korelowała z ekspresją niektórych cytokin jednak zabrakło przedyskutowania tego zjawiska w kontekście odpowiedzi immunologicznej. **Proszę Doktorantkę o stosowny komentarz.**

Ponadto, Doktorantka przedstawiła, że ekspresja CD44 jest znacząco wyższa w HNSCC (HPV-). **Czy w związku z tym obecność HPV w komórkach nowotworowych jest czynnikiem prognostycznym?**

#### **Podsumowanie i wnioski końcowe**

Podsumowując uważam, że mgr Alicji Głuszko osiągnęła stawiane sobie cele naukowe. Jej prace doświadczalne zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym jak również były prezentowane na wielu konferencjach naukowych. Dodatkowo, Doktorantka jest współautorką wielu prac opublikowanych w czasopismach międzynarodowych oraz w recenzowanych materiałach z konferencji międzynarodowych o łącznym IF 39.87. Świadczy to o doskonałym warsztacie naukowym i ogromnym potencjale Doktorantki a także o jej zaangażowaniu w wiele projektów naukowych.

W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Alicji Głuszko do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie Jej rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK  
ZAKŁADU IMMUNOTERAPII  
EKSPERYMENTALNEJ  
  
dr hab. Elżbieta Samowska  
prof. Instytutu