

Warszawa, dn. 24.06.2025r.

Recenzent :

Prof. zwyczajny dr hab. n. med. Stanisław Niemczyk

Kierownik Kliniki Chorób Wewnętrznych,

Nefrologii i Dializoterapii

Wojskowy Instytut Medyczny-

Państwowy Instytut Badawczy

Przedstawiam recenzję rozprawy doktorskiej na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne lek. Anny Brodziak, pt. „Rola przekaźnika β 2-adrenergicznego w patogenezie raka brodawkowego nerki” zgodnie z Uchwałą Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM z dnia 21.05 2025r

Promotorzy:

prof. dr hab. n.med. Agnieszka Cudnoch – Jędrzejewska

prof. dr hab. n.med. Anna Małgorzata Czarnecka

Praca ma typowy układ, liczy 95 stron. zawiera tabele w ilości sześciu i ryciny łącznie 19. Piśmiennictwo jest aktualne w sumie 163 pozycji, głównie anglojęzycznych, zagranicznych.

Wstęp to połowa pracy.

Wprowadza czytelnika w problemy raka nerkowokomórkowego, receptora β 2-adrenergicznego, w tym opisuje substancje wpływające na przekaźnictwo β 2-adrenergiczne w kontekście nowotworów, jak również wpływ receptorów β 2-adrenergicznych na patofizjologię nowotworów złośliwych w kontekście proliferacji, angiogenezy, wpływu na odpowiedź immunologiczną i macierzyste komórki nowotworowe. Ocenia dane epidemiologiczne i kliniczne w tym zakresie.

Założenia pracy

Stres jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju i progresji chorób nowotworowych. Wpływ katecholamin działających poprzez receptory β -adrenergiczne został wykazany w przypadku wielu typów nowotworu. W odniesieniu do RCC nie ma obecnie przekonujących danych literaturowych wskazujących na rolę β -ARs w rozwoju i patogenezie tego nowotworu. Biorąc pod uwagę wysoką ekspresję receptorów β -ARs w RCC (brodawkowaty rak nerki), udokumentowany wpływ β -ARs – a w szczególności podtypu β_2 – na karcynogenezę w innych nowotworach oraz brak badań dotyczących roli tych receptorów w patofizjologii RCC, za cel pracy przyjęto zbadanie roli przekąźnictwa β_2 -adrenergicznego w pRCC.

Podjęcie tematu, sam pomysł i hipoteza mają wartość samą w sobie.

Cele

Celem niniejszej pracy była ocena roli β_2 -ARs w patofizjologii pRCC.

W ramach pierwszej części pracy wykonano analizę bioinformatyczną TCGA, w której postawiono poniższe cele (Część I): Ocena poziomu ekspresji genu *ADRB2* w dwóch najczęstszych podtypach histologicznych RCC; Korelacja poziomu ekspresji genu *ADRB2* z parametrami kliniczno-patomorfologicznymi pRCC; Korelacja poziomu ekspresji genu *ADRB2* z rokowaniem pacjentów z pRCC.

W ramach drugiej części pracy przeprowadzono badania na liniach komórkowych wyprowadzonych z guza pierwotnego i przerzutu pRCC. Cele tej części doświadczeń obejmowały (Część II): Zbadanie wpływu antagonistB2-Ars na żywotność komórek pRCC i ocenę wpływu antagonistów i agonistów B2-Ars na ekspresję w komórkach nowotworowych genów związanych z fenotypem CSCs.

Material i metody

Analiza ekspresji genu *ADRB2* została przeprowadzona na danych transkryptomicznych i klinicznych pacjentów z pRCC, dostępnych w bazie The Cancer Genome Atlas (TCGA).

Część doświadczalna obejmowała hodowle linii komórkowych RCC: wywodzących się z pRCC (Caki-2 i ACHN) i ccRCC (Caki-1, 786-O). Przy pomocy qRT-PCR oceniono różnice w poziomie ekspresji genu *ADRB2* między komórkami pRCC i ccRCC. Komórki wywodzące się z pRCC poddawano działaniu salbutamolu (selektywny agonista β_2 -AR) oraz ICI-118,551

(selektywny antagonist β_2 -AR) w różnych stężeniach i przeprowadzono ocenę ich żywotności. Następnie w komórkach tych metodą qRT-PCR oceniano poziom ekspresji genów związanych z fenotypem CSCs (*POU5F1* i *NES*) oraz angiogenezą (*VEGFA* i *FLT1*) w komórkach poddanych działaniu β_2 -agonisty i β_2 -antagonisty.

Hodowle komórkowe ;

Do doświadczeń użyto następujących linii komórkowych:

- Caki-1 (ATCC® HTB-46™),
- Caki-2 (ATCC® HTB-47™), • 786-O (ATCC® HTB-CRL-1932™),
- ACHN (ATCC® CRL-1611™).

Ocena żywotności komórek – test z AlamarBlue - nowoczesna metodologia.

Komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w liczbie uzależnionej od tempa podziałów: 6000 komórek na dołek w przypadku linii ACHN, 3000 komórek na dołek dla linii Caki2 i 786-O, 4000 komórek na dołek dla linii Caki1. Po 48h wymieniano pożywkę na świeżą (100 μ l) z dodatkiem badanych substancji: salbutamol .

Kolejne etapy to; **„Izolacja RNA , Ilościowa Reakcja Łańcuchowa Polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) ,**

Analiza bioinformatyczna The Cancer Genome Atlas – to bardzo ważna metodologicznie część pracy.

Analizie statystycznej poddano dane z bazy TCGA (<https://www.cancer.gov/tcga>). TCGA to projekt zainicjowany przez Narodowy Instytut Raka (ang. *National Cancer Institute*, NCI), gromadzący dane genomyczne i kliniczne z ponad 20 tysięcy próbek reprezentujących 33 typy nowotworów. Na podstawie danych zgromadzonych w powyższej bazie dokonano analizy ekspresji genu *ADRB2* wśród różnych nowotworów, a następnie pomiędzy próbkami pacjentów z rozpoznaniem ccRCC i pRCC. Analizę statystyczną przeprowadzono używając testu log rank i Chi kwadrat z wykorzystaniem cBioPortal(129,130). Następnie na podstawie danych zgromadzonych w *The Cancer Genome Atlas Kidney Renal Papillary Cell Carcinoma* dokonano analizy pomiędzy ekspresją genu *ADRB2* a danymi klinicznymi i patologicznymi u pacjentów z rakiem brodawkowatym nerki(17). Poziom ekspresji mRNA został znormalizowany względem ekspresji mRNA w prawidłowej tkance (log RNA Seq V2 RSEM) i przedstawiony w postaci Z-score. Pacjentów podzielono na 2 grupy: chorych z wysoką

ekspresją genu *ADRB2* (poziom ekspresji w porównaniu do ekspresji w tkance prawidłowej powyżej średniego poziomu w kohorcie; $ADRB \geq 0$) oraz z niską ekspresją (poziom ekspresji w porównaniu do ekspresji w tkance prawidłowej poniżej średniego poziomu w kohorcie; $ADRB < 0$). Na podstawie powyższego podziału przeprowadzono analizy zależności ekspresji i parametrów klinicznych (stopień zaawansowania klinicznego, obecność przerzutów do węzłów chłonnych) oraz analizy przeżycia wykorzystując estymator Kaplana-Meiera (131).

Wyniki:

Analiza danych TCGA wykazała, że niższy poziom ekspresji *ADRB2* u pacjentów z pRCC korelował z częstszym występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych, wyższym stopniem zaawansowania klinicznego w momencie rozpoznania oraz krótszym czasem przeżycia całkowitego (OS) i wolnego od progresji (PFS). W badaniach in vitro zastosowanie antagonisty β_2 -AR (ICI-118,551) w stężeniu 100 μ M skutkowało istotnie statystycznym zmniejszeniem żywotności komórek obu linii komórkowych pRCC: Caki-2 i ACHN. ICI-118,551 podany w stężeniach 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M powodował również zmniejszoną żywotność komórek linii ACHN. W komórkach poddanych działaniu ICI118,551 zaobserwowano złożony wpływ na ekspresję wykładników CSCs: wzrost ekspresji *POU5F1* w obu liniach komórkowych i spadek ekspresji *NES* (istotność statystyczną wykazano w linii Caki-2). Podanie ICI-118,551 wywierało również wpływ na poziom ekspresji genów związanych z angiogenezą: spadek ekspresji *VEGF-A* w linii wywodzącej się z przerzutu pRCC oraz kompensacyjny wzrost ekspresji *VEGFR1* w obu liniach komórkowych (Caki-2 i ACHN). Podanie agonisty β_2 -AR salbutamolu nie wpływało na żywotność komórek pRCC oraz ekspresję genów związanych z CSCs i angiogenezą. Na wyniki badań składają się: wyniki analizy bioinformatycznej The Cancer Genome Atlas, wyniki analizy qRT-PCR ekspresji genu *ADRB2* w liniach komórkowych raka nerkowokomórkowego, wpływ β_2 -agonisty i antagonisty na żywotność komórek raka nerkowokomórkowego, wpływ β_2 -agonisty i antagonisty na ekspresję genów związanych z fenotypem macierzystych komórek nowotworowych raka brodawkowego nerki, wpływ β_2 -agonisty i antagonisty na ekspresję genów związanych z angiogenezą nowotworowych raka brodawkowego nerki.

Dyskusja jest ciekawa i kompetentna, wystarczająca, bardzo wzbogaca pracę.

Wnioski

Część I: Ekspresja genu *ADRB2* jest wyższa w liniach komórkowych wywodzących się z pRCC niż ccRCC, niski poziom ekspresji genu *ADRB2* korelował z wyższym

zaawansowaniem klinicznym pRCC: zajęciem węzłów chłonnych i obecnością przerzutów odległych, niski poziom ekspresji genu *ADRB2* jest negatywnym czynnikiem prognostycznym u pacjentów z rozpoznaniem pRCC.

Część II: .Blokada β_2 -ARs poprzez ekspozycję komórek na selektywnego antagonistę (ICI118,551) prowadzi do zmniejszenia żywotności komórek pRCC., blokada β_2 -ARs poprzez podanie antagonisty (ICI-118,551) wywiera złożony wpływ na fenotyp CSCs komórek linii pRCC, mogący potencjalnie prowadzić do selekcji komórek o fenotypie CSCs, blokada β_2 -ARs poprzez podanie antagonisty (ICI-118,551) może wywierać wpływ na zmniejszoną ekspresję wykładników angiogenezy (tj. spadek ekspresji *VEGF-A* oraz kompensacyjny wzrost ekspresji *VEGFR1*), wywieranie agonistycznego wpływu na β_2 -ARs poprzez podanie salbutamolu nie wpływa na żywotność komórek i ekspresję genów związanych z angiogenezą i CSCs.

Wnioski bezpośrednio wynikają z wyników pracy.

Wyniki sugerują że β -AR, a w szczególności podtyp 2 tego receptora może ogrywać potencjalną rolę w patofizjologii pRCC. Mechanizmy wpływu przekąźnictwa β_2 adrenergicznego na nowotwór wymagają dalszych badań przedklinicznych jak i klinicznych w tym zakresie. Potencjalnie ma to istotne znaczenie kliniczne.

Praca ma wysokie walory metodologiczne, naukowe, właściwą szatę i potencjalnie znaczenie kliniczne.

Autor zawarł informacje o ograniczeniach pracy doświadczalnej w aspekcie klinicznym.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. . Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018. poz.1668). Wnoszę do Wysockiej Rady o dopuszczenie pracy lekarza Anny Brodziak do dalszych etapów procedury na przyznanie stopienia naukowego doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Jednocześnie ze względu na walory metodologiczne i wartość naukową oraz całokształt pracy wnoszę o Jej wyróżnienie.

