

Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii  
i Alergologii  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
ul. Jaczewskiego 8  
Lublin 20-950  
tel. (81) 724 44 31, (81) 724 42 93  
fax (81) 724 48 23  
kierownik:  
Prof. dr hab. Janusz Milanowski



Department of Pneumology, Oncology  
and Allergology  
Medical University of Lublin  
Poland, Lublin 20-950  
Jaczewskiego 8  
tel. (+48-81) 724 44 31, (+48-81) 724 42 93  
fax (+48-81) 724 48 23  
Head:  
Prof. Janusz Milanowski MD, PhD

e-mail: [pulm.dept@am.lublin.pl](mailto:pulm.dept@am.lublin.pl)

## OCENA

### ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK BIOLOGICZNYCH W ZAKRESIE BIOCHEMII

MGR MARTYNY FILIPSKIEJ

### PT. "WPŁYW WYBRANYCH mikroRNA NA AGRESYWNY FENOTYP I CHEMIOOPORNOŚĆ

### KOMÓREK PŁASKONABŁONKOWEGO RAKA PŁUCA"

Rak płuca jest najczęściej diagnozowanym nowotworem na świecie stanowiącym najczęstszą przyczynę śmierci wśród mężczyzn, a w krajach wysoko rozwiniętych również wśród kobiet. Rokowanie w tej chorobie jest niekorzystne, a odsetki przeżyć 5-cio letnich w stadiach zaawansowanych są niewielkie, szczególnie w przypadku nowotworu nieoperacyjnego w stadium IIIB i IV, kiedy to nie przekraczają kilku procent. Poza prewencją mającą na celu ograniczenie wpływu czynników środowiskowych, takich jak narażenie na dym tytoniowy oraz azbest, podejmowane są próby identyfikacji nowych celów terapeutycznych oraz efektywniejszych sposobów leczenia. Aktualnym tematem badań jest również identyfikacja nowych cząsteczek, które stosowane łącznie z istniejącymi terapiami mogą zwiększać ich efektywność.

W tę niezwykle ważną tematykę wpisuje się przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Martyny Filipskiej. Autorka podjęła się zbadania biologicznej roli wybranych mikroRNA (miR-192-5p, miR-192-3p oraz miR-66-5p) w powstawaniu chemiooporności oraz agresywnego fenotypu komórek płaskonabłonkowego raka płuca. Wybór mikroRNA opierał

się na wynikach wcześniejszej pracy, w której wykazano nadekspresję tych cząsteczek u chorych w operacyjnych stadiach płaskonabłonkowego raka płuca. Mgr Filipka swoje eksperymenty przeprowadziła natomiast na liniach komórkowych w warunkach hodowli *in vitro*.

Przedstawiona do recenzji rozprawa liczy 104 strony maszynopisu. Ma układ nieco odmienny od zazwyczaj stosowanego w tego rodzaju opracowaniach. Zasadnicza część pracy liczy 81 stron w tym 8 tabel i 30 rycin. Tą część pracy rozpoczyna bardzo krótkie streszczenie w języku polskim i angielskim. Dla tak obszernego opracowania, streszczenie wydaje się być zbyt lakoniczne (1 strona wydruku komputerowego). Rozprawa opatrzona jest 184 pozycjami piśmiennictwa, z czego większość została opublikowana w międzynarodowych, recenzowanych czasopismach anglojęzycznych. Literatura jest w większości bardzo aktualna i odpowiednio dobrana. W pracy brakuje wniosków, które byłyby konkretną odpowiedzią na postawione cele pracy. Oczywiście pojawiają się obszerne wnioski w dyskusji i bardzo skrótowe podsumowanie. Po części zasadniczej pracy dodano trzy aneksy z wynikami uzupełniającymi zawierającymi kilkanaście rycin i tabel oraz ze spisem odczynników i aparatury, a także ze spisem skrótów. Taki układ pracy nieco utrudnia jej płynną lekturę z uwagi na koniczność poszukiwania odpowiednich odnośników i informacji.

W liczącym 26 stron „Wstępie” Autorka przestawiła pobieżnie dane dotyczące epidemiologii raka płuca, metod diagnostycznych oraz zasad leczenia tej choroby w zależności od rozpoznania patomorfologicznego i stopnia zaawansowania. Z uwagi na skrótowy charakter tej części wstępu wkradły się do niej pojedyncze błędy. Podział patomorfologiczny raka płuca został oparty o publikację Pikor i wsp. z roku 2013, a nie na aktualnej „WHO classification of tumors of the lung, pleura, thymus and heart”. Ponadto wśród metod stosowanych w diagnostyce mutacji somatycznych u chorych na NDRP w kwalifikacji do terapii ukierunkowanych molekularnie autorka nie wymieniła klasycznego real-time PCR, który nadal jest podstawową metodą w tym wskazaniu (wg zaleceń IASLC,

CAP i AMP). Wymieniając leki ukierunkowane molekularnie i immunoterapeutyki zarejestrowane w krajach UE autorka pominęła kilka, w tym przede wszystkim ozymertynib, niwolumab i nintedanib. Bardzo szeroko i z dużą wiedzą Autorka opisuje biogenezę mikroRNA i różnorodne jego funkcje oraz rolę w powstawaniu i rozwoju chorób nowotworowych, a także metody analizy funkcjonalnej cząsteczek mikroRNA. Ta część wstępu jest najbardziej wartościowa i oryginalna. Autorka nieco zbyt skrótowo opisuje niektóre procesy. Np. na stronie 17 pojawia się zdanie „Do białek regulowanych przez wspomniane miRNA należą powszechnie znane proto-onkoproteiny...”. Trzeba jednak pamiętać, że celem mikroRNA jest mRNA, przez co pośrednio te cząsteczki mogą wpływać na ekspresję białek. W przygotowaniu publikacji Autorka powinna uważać na tego rodzaju skróty myślowe.

Cele pracy zostały sformułowane w sposób jasny i odpowiadający założeniom metodologicznym pracy.

W rozdziale „Materiał i Metody”, liczącym 14 stron, mgr Martyna Filipka opisuje stosowaną metodykę doświadczalną. Badania przeprowadzone zostały przy wykorzystaniu hodowli linii komórek nowotworowych. Oceniono szereg parametrów przy wykorzystaniu najnowocześniejszych i skomplikowanych metod badawczych. Opisowi metodyki towarzyszą liczne tabele, wskazujące na bardzo dobre opanowanie stosowanych technik i rzetelność ich wykonania (tabele te występują zarówno w zasadniczym tekście, jak i w pierwszym aneksie). Do najważniejszych metod badawczych wykorzystanych przez Autorkę należą: ilościowy PCR z odwrotną transkrypcją zastosowany w celu oceny ekspresji względnej mikroRNA, konstrukcja wektorów reporterowych z DNA plazmidowego oraz klonowanie miejsc wiązania mikroRNA do tych wektorów, transfekcja linii komórkowych skonstruowanymi wcześniej wektorami, a także testy umożliwiające ocenę chemiooporności i agresywności komórek nowotworowych przed transfekcją i po niej (test cytotoksyczny MTT, test migracyjny, test inwazyjności, test klonogenności). Całość metodyki kończy analiza transkryptomu z

wykorzystaniem techniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS) na wysokoprzepustowym aparacie Illumina HiSeq 2500. Jeszcze raz należy podkreślić znakomity warsztat badawczy wykorzystywany przy realizacji badań do tej rozprawy doktorskiej.

W rozdziale „Wyniki”, który liczy 15 stron, Autorka dość skrótowo przedstawiła rezultaty poszczególnych eksperymentów uzupełniając je licznymi i dobrze opracowanymi tabelami. Najważniejsze wyniki dowodzą, że obniżenie ekspresji miR192-5p oraz miR-662-5p uwrażliwia komórki raka płaskonabłonkowego na etopozyd, ale nie na cisplatynę. Wyciszenie badanych cząsteczek mikroRNA powodowało wzrost chemiowrażliwości, obniżenie zdolności komórek do migracji oraz obniżenie klonogenności. Dlatego być może cząsteczki te mogą w przyszłości stać się celami terapeutycznymi.

Uzyskane wyniki zostały omówione w rozdziale „Dyskusja”, która liczy 12 stron. Autorka wykazała się świetną znajomością przedmiotu oraz obiektywizmem w ocenie własnych wyników. Dyskusja ściśle dotyczy przedmiotu przeprowadzonych badań. Zaznaczyć należy, że zrealizowane badania stały się podstawą zgłoszenia patentowego.

Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora. Wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed w Gdańsku wniosek o dopuszczenie mgr Martyny Filipskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej, jeśli doktorantka spełnia pozostałe kryteria „Regulaminu wyróżniania rozpraw doktorskich” Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed w Gdańsku.

1124262 Prof. dr hab. n. med. Paweł Krawczyk  
lekarz chorób wewnętrznych  
specjalista laboratoryjnej genetyki medycznej  
specjalista laboratoryjnej immunologii medycznej

Lublin, 21.05.2019.