



WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD PATOLOGII KOMÓRKI

ul. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

www.biotech.uni.wroc.pl

PA	04-01-2022
Wp. data	04-01-2022
L.dz.	4

Dr hab. Dorota Nowak, prof. UWr

Wrocław, 3 stycznia 2022

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Pauliny Banach zat.
„Zróżnicowanie profilu ekspresji mikroRNA w osoczu i wybranych
tkankach w przerzutującym i nieprzerzutującym raku gruczołu
sutkowego”**

Rak piersi jest nowotworem złośliwym powszechnie występującym we wszystkich regionach świata. W polskich statystykach onkologicznych wśród populacji kobiet zajmuje, obok raka płuc, czołowe miejsce. Pomimo znaczącego postępu efektów leczenia onkologicznego, dostępu do nowoczesnych terapii w naszym kraju wskaźniki przeżyć w przypadku nowotworów piersi są ciągle znacząco niższe niż w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie czy w Skandynawii. Stąd zarówno pogłębianie wiedzy dotyczącej molekularnych podstaw powstawania i rozprzestrzeniania raka piersi, jaki i formułowanie nowych strategii terapeutycznych stanowi niezwykle istotny cel współczesnej onkologii. Odrębnym zagadnieniem jest poszukiwanie i udoskonalanie metod diagnostyki molekularnej, kluczowej w profilaktyce oraz ocenie zaawansowania choroby.

Praca doktorska pani mgr inż. Joanny P. Banach włącza się w nurt tego typu badań. Dotyczy bowiem możliwości zastosowania określonych cząsteczek mikroRNA w rozpoznawaniu nowotworów gruczołu sutkowego różnego typu.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana pod kierunkiem pani prof. dr hab. Joanny Wietrzyk z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda Polskiej Akademii. Drugim promotorem pracy jest pan prof. dr hab. Rafał Matkowski z Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, zaś promotorką pomocniczą pani dr inż. Dagmara Kłopotowska z IiTD PAN. Badania obejmujące projekt doktorski były przeprowadzone w Laboratorium Doświadczalnej Terapii

Przeciwnowotworowej w Zespole posiadającym bardzo duże doświadczenie w badaniach tego typu.

Oceniana przeze mnie praca liczy 145 stron, w tekście zamieszczono 24 ryciny, 18 tabel i cytowano 262 pozycje literaturowe. Pewien niedosyt budzi jednak fakt, że wśród zacytowanych prac jedynie 25% pochodzi z ostatnich pięciu lat, a przecież temat podjęty w pracy doktorskiej jest niezwykle aktualny.

Rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Banach ma układ typowy dla tego typu opracowań. W 36 stronicowym „Wstępie” Autorka przedstawiła informacje przybliżające temat i ułatwiające czytelnikowi zrozumienie całości pracy. Na początku tego rozdziału Doktorantka zamieszcza dane dotyczące raka piersi – epidemiologii, klasyfikacji histologicznej oraz diagnostyki molekularnej. Następnie zapoznaje czytelnika z zagadnieniem dotyczącym mikroRNA – zarówno biogenezy, znaczenia tych cząsteczek w komórce jak i zmian w ich poziomie w różnych typach nowotworów, w tym raka piersi. Zakres informacji zawartych we wstępie jest adekwatny do opisanych później wyników i nie zawiera zbędnych wątków. Uświadamia złożoność zagadnienia, mnogość informacji, często rozbieżnych, dotyczących poziomu czy aktywności wielu różnych cząsteczek mikroRNA w chorobach nowotworowych.

Badania prowadzone w ramach ocenianej przeze mnie pracy doktorskiej zostały zaplanowane bardzo szeroko, co jest jej zaletą ale też pewnym mankamentem. Z tego też powodu rozdział „Materiały i metody” w tym przypadku pełni zasadniczą rolę dla zrozumienia i analizy późniejszych wyników. Autorka zawarła w nim niezbędne informacje na temat stosowanych trzech modeli badawczych. W czasie realizacji niniejszej pracy pani mgr Banach pracowała na liniach komórkowych raka sutka – 8 ludzkich i 11 mysich. Ponadto badania prowadzone były na modelu zwierzęcym, który stanowiły myszy z indukowanym nowotworem sutka – 4T1 (wariant przerzutujący) oraz 67NR (wariant nieprzerzutujący). W końcowym etapie pracy analizy były prowadzone na próbach pobranych od pacjentek z rakiem piersi (biopsje oraz osocze) operowanych w Dolnośląskim Centrum Onkologii. Informacje o wszystkich stosowanych próbach zostały przedstawione w sposób uporządkowany, głównie dzięki zamieszczonym tabelom (tabele 8-11 oraz 14-16) oraz dzięki przejrzystemu schematowi (Ryc 9) obrazującemu przebieg doświadczeń na

modelu *mysim*. Jednak sporym problemem dla mnie jako recenzentki była niewystarczająca informacja na temat liczby stosowanych prób biologicznych. Niestety z tym problemem spotkałam się również podczas czytania rozdziału „Wyniki”. Badania podejmowane w pracy mają charakter przesiewowy więc odpowiednia ilość prób i powtórzeń jest kluczowa dla właściwej analizy uzyskanych rezultatów i wyciągnięcia wniosków końcowych.

Czytając rozdział „Materiały i metody” nie znalazłam wyraźnych informacji o liczbie powtórzeń stosowanych w badaniach *in vivo* i *in vitro*.

Bardzo czytelnie natomiast zostały zdefiniowane próby pochodzące od pacjentek. Przy opisie eksperymentu z użyciem zwierząt Doktorantka na początku rozdziału „Wyniki” cytuje pracę opublikowaną w czasopiśmie *Cancers* w 2020 roku (pozycja 225), w której opisany jest eksperyment. Pani Banach nie jest jednak współautorką tej pracy więc trudno ocenić czy korzystała z prób opisanych w publikacji, czy też może jest to analogiczny eksperyment. Byłabym wdzięczna za uporządkowanie takich informacji w trakcie publicznej obrony pracy.

Najbardziej interesujący rozdział rozprawy doktorskiej to oczywiście „Wyniki”, w którym Doktorantka przedstawia główne rezultaty swoich eksperymentów dotyczących ustalenia zróżnicowania profilu ekspresji mikroRNA w osoczu i wybranych tkankach w przerzutującym i nieprzerzutującym raku gruczołu sutkowego.

W pierwszym etapie zostały przeprowadzone badania przesiewowe wykorzystujące próby pochodzące od myszy z indukowanym nowotworem 4T1 oraz 67NR, mające na celu wytypowanie najbardziej obiecujących cząsteczek mikroRNA, które będą podstawą dalszych analiz. Eksperymenty zostały przeprowadzone na próbach pochodzących z guza, przerzutu do płuc oraz osocza, w których za pomocą techniki PCR określony został poziom ekspresji 84 różnych cząsteczek mikroRNA. Na tej podstawie do dalszych badań zostały wybrane trzy cząsteczki mikroRNA – miR147-3p, miR223-3p oraz miR-31-5p. Na tym etapie oceny pracy doktorskiej chciałabym wyrazić pewną wątpliwość, która zrodziła się po analizie Ryciny 10, na str.77. Na wykresach, które posłużyły do selekcji właściwych cząsteczek nie ma informacji o ilości prób i ocenie statystycznej wyników, dlatego prosiłabym Doktorantkę o uzupełnienie tej

informacji. W kolejnych etapach pracy poziom ekspresji dla wytypowanych cząsteczek był następnie wyznaczany w lizatach pochodzących z ludzkich oraz mysich komórek linii raka sutka, należących do różnych, opisanych we wstępie podtypów molekularnych. Następnie analogiczne badania przeprowadzono na próbach pochodzących od pacjentek. Analizą objęto osocze pochodzące od: 50 pacjentek z nowotworem nieprzerzutującym lub z przerzutującym do węzłów chłonnych oraz 30 z nowotworem dającym odległe przerzuty. Jeśli chodzi o próby wyizolowane z guza, badania dotyczyły 30 kobiet z nowotworem nieprzerzutującym lub z przerzutującym do węzłów chłonnych oraz 5 z nowotworem dającym odległe przerzuty. Wyniki uzyskane dla prób pacjentek z chorobą nowotworową porównano z wynikami otrzymanymi dla zdrowych dawczyń. Ocena poziomu ekspresji wytypowanych cząsteczek mikroRNA na trzech stosowanych w pracy modelach badawczych nie dała jednoznacznych rezultatów, co było do przewidzenia biorąc pod uwagę ich mnogość i prawdopodobnie zbyt małą ilość poszczególnych typów prób. Nie mniej jednak wytypowane cząsteczki mikroRNA były obecne w badanych materiałach na różnym poziomie. Dlatego w kolejnym etapie pracy pani mgr Banach podjęła się zadania korelacji uzyskanych wyników z danymi określającymi poziom białek istotnych w procesie inwazyjności nowotworów. Zadanie to realizowała stosując miR-31-5p, ze względu na najbardziej obiecujące rezultaty uzyskane dla tej cząsteczki na wcześniejszych etapach pracy. Skoncentrowała się na białkach będących markerami przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego takich jak E- i N-kadheryna. Doktorantka dokonała również oceny wpływu cząsteczki miR-31-5p na zdolności adhezyjne komórek nowotworowych oraz oceny poziomu białek docelowych dla tego mikroRNA w komórkach linii ludzkiego raka gruczołu sutkowego po wyciszeniu i przejściowej nadekspresji miR-31-5p.

Ostatnim rozdziałem ocenianej przeze mnie pracy jest 14 stronicowa „Dyskusja”. W rozdziale tym Autorka omawia uzyskane przez siebie rezultaty dotyczące mikroRNA -147-3p, -223-3p oraz -31-5p na tle danych literaturowych. To trudne zadanie, biorąc pod uwagę mnogość doniesień, często pozostających w sprzeczności.

Podsumowując, wyniki przedstawione w pracy doktorskiej pani mgr Joanny Banach wskazują, że poziom cząsteczki miR-31-5p jest obniżony w osoczu

zarówno u myszy z przerzutującym rakiem gruczołu sutkowego jak i u pacjentek z przerzutującym nowotworem. Ponadto wysoki poziom ekspresji tej cząsteczki wydaje się szczególnie istotny w przypadku nowotworu gruczołu sutkowego o podtypie HER2. Rezultaty przedstawione w pracy doktorskiej pokazują, że cząsteczka miR-31-5p może być regulatorem adhezji komórkowej tak istotnej w procesie przerzutowania nowotworów. Autorka wskazuje również na możliwość przeciwprzerutowego działania badanego mikroRNA, co obserwuje w liniach komórkowych niezależnie od badanego podtypu nowotworu.

Dokonując analizy swoich rezultatów Doktorantka bardzo ostrożnie wyciąga wnioski, wskazuje na ich przesiewowy charakter i konieczność pogłębionych badań. Nie mniej jednak wydaje się, że cząsteczka miR-31-5p może być w przyszłości potencjalnym celem w diagnostyce molekularnej w raku gruczołu sutkowego, mierzonym w krwi pacjenta. Z tego względu wyniki przedstawione w pracy są cenne i mają potencjał aplikacyjny. Zagłębiając się w lekturę przedstawionej do oceny pracy doktorskiej zadawałam sobie jednak kilka pytań. Biorąc pod uwagę mnogość cząsteczek mikroRNA zastanawiałam się jak duże znaczenie w ich diagnostycznym zastosowaniu będzie miała zmienność osobnicza czy wiek pacjenta. Problemem jest również fakt, że zmienione poziomy mikroRNA obserwowane są nie tylko w chorobach nowotworowych ale również w innych schorzeniach i procesach zachodzących w komórce. Chętnie usłyszałabym opinię Autorki pracy w kwestii nurtujących mnie wątpliwości.

Oceniana przeze mnie praca doktorska została napisana poprawną polszczyzną i starannie opracowana pod względem edytorskim. Zawiera pewne błędy stylistyczne i literowe ale nie mają one wpływu na moją jej ocenę.

Analizując dorobek publikacyjny Pani mgr Joanny Banach stwierdzam, że jest Ona współautorką dziewięciu publikacji o wysokim współczynniku oddziaływania (IF ok. 48), cytowanych 58 razy. Prace nie dotyczą zagadnień opisanych w pracy doktorskiej ale świadczą o szerszych zainteresowaniach Doktorantki.

Reasumując, rozprawę doktorską pani mgr Joanny P. Banach oceniam bardzo pozytywnie. W moim przekonaniu Autorka uzyskała interesujące wyniki, które stanowią podstawę do dalszych, szczegółowych badań. Ponadto uzupełniają wiedzę o molekularnych mechanizmach działania

wybranych mikroRNA w komórkach raka gruczołu sutkowego. Dlatego stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr inż. Joanny Pauliny Banach spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.IJ.Nr 65 poz. 595; z p62n. zm.), zgodnie z art.175.1. ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'D. Paulina', written in a cursive style.