

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kacpra Gugłasa
pt. „Biologiczna rola YRNA w płaskonabłonkowych nowotworach głowy i szyi”

Przedłożona mi do oceny praca doktorska została wykonana w Pracowni Genetyki Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu, pod kierunkiem dr hab. n. biol. Katarzyny Lamperskiej i promotora pomocniczego dr n.med. Tomasza Sebastiana Kolendy.

Rozprawa doktorska została przygotowana jako zbiór trzech opublikowanych i ściśle powiązanych tematycznie artykułów naukowych, które zostały poprzedzone wstępem w języku polskim i angielskim.

Na cykl prac składają się 3 artykuły (dwie prace eksperymentalne i jedna przeglądowa) opublikowane w czasopiśmie: **Cells (IF: 6,6 MEIN: 140)**, **Int Mol Sci (IF: 5,924 MEIN: 140)**, **(Biomedicines IF: 4,7, MEIN: 100)**.

Nowotwory złośliwe głowy i szyi to w 85 - 90% przypadków raki płaskonabłonkowe. Czynniki ryzyka sprzyjające rozwojowi tego typu nowotworów są dobrze określone. Obejmują one podrażnienie błon śluzowych najczęściej dymem tytoniowym i wysokoprocentowym alkoholem, inną przyczyną może być infekcja wirusem HPV.

Pomimo postępów w chirurgii onkologicznej i zastosowaniu różnych metod chemio- i radioterapii w nowotworach głowy i szyi osiągnięto niewielką poprawę wskaźników przeżycia chorych. Wskazuje to na potrzebę znalezienia nowych biomarkerów kancerogenezy i progresji zmian nowotworowych, które pozwoliłyby na wprowadzenie innowacyjnych i skutecznych klinicznie algorytmów terapeutycznych, szczególnie w przypadku wznowy procesu nowotworowego oraz występowania przerzutów do węzłów chłonnych.

W tym kontekście miRNA, pełniąc rolę genów regulatorowych onkogenezy, stanowią grupę obiecujących potencjalnych wskaźników molekularnych, które mogłyby być wykorzystane jako czynne modyfikatory odpowiedzi w nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej. Przykładem takich miRNA jest grupa YRNA, która stała się przedmiotem pracy doktorskiej.

Badanie zmiany w profilu ekspresji wybranych miRNA mogłoby dostarczyć szeregu informacji o czułości tych nowotworów na planowaną terapię lub stanowić praktyczne narzędzie kontroli poszczególnych etapów leczenia.

Głównym celem pracy doktorskiej magistra Kacpra Gugłasa było określenie biologicznej roli YRNA w płaskonabłonkowych nowotworach obszaru głowy i szyi (ang. HNSCC).

Dodatkowymi celami było: badanie poziomu ekspresji YRNA w liniach komórkowych HNSCC i tkankach pacjentów HNSCC, korelacja poziomu YRNA z cechami kliniczno-patologicznymi; określenie roli YRNA w zakażeniach wirusem HPV, wskazanie procesów i ścieżek molekularnych związanych ze zmianą poziomu YRNA1 w komórkach nowotworowych oraz określenie znaczenia klinicznego i diagnostycznego YRNA.

Omówienie zbioru 3 prac zostało przygotowane bardzo dobrze i stanowi wyczerpujące podsumowanie publikacji dotyczących badań związanych z określeniem biologicznej roli YRNA w płaskonabłonkowych nowotworach obszaru głowy i szyi. Zestaw publikacji stanowiący podstawę pracy doktorskiej jest spójny pod względem merytorycznym i dostarcza wszechstronnej wiedzy w badanej tematyce.

Prace badawcze prowadzone przez Doktoranta były wspierane finansowo przez dwa granty (stypendium w ramach programu PO WER i grant wewnętrzny Wielkopolskiego Centrum Onkologii).

Z przedstawionych w rozprawie oświadczeń oraz odpowiednich sekcji zamieszczonych w artykułach naukowych wynika, że Pan Kacper Guglas miał ważny i twórczy udział w powstanie artykułów naukowych wchodzących w skład zbioru składającego się na rozprawę doktorską. Ponadto jest On pierwszym autorem we wszystkich trzech prezentowanych publikacjach. Dorobek publikacyjny Kandydata oceniam jako bardzo dobry.

W ramach rozprawy doktorskiej Autor zamieścił wstęp teoretyczny, założenia i cel naukowy wybranych prac badawczych oraz w syntetyczny sposób opisał wyniki uzyskane w poszczególnych publikacjach.

W ostatnich latach dużym zainteresowaniem w medycynie zaczęły cieszyć się badania z udziałem niekodujących RNA (ang. ncRNA). Wykazano, że ich profil zmienia się w chorobach nowotworowych co może wpływać na procesy związane z proliferacją nowotworową. Wśród ncRNA można wyróżnić zarówno długie jak i krótkie, niekodujące RNA. Do grupy krótkich, niekodujących RNA należą YRNA, (YRNA1, YRNA3, YRNA4 i YRNA5), które stały się przedmiotem badań mgr Guglasa.

Dotychczas brakowało tak rozwiniętej analizy dotyczącej znaczenia biologicznego, klinicznego oraz diagnostycznego YRNA w płaskonabłonkowych nowotworach obszaru głowy i szyi.

Jak dotąd wiadomo było, że główną funkcją YRNA jest udział w inicjacji replikacji DNA poprzez uczestnictwo w powstaniu nowych widełek replikacyjnych.

Analiza funkcji YRNA w płaskonabłonkowych nowotworach obszaru głowy i szyi (HNSCC), nie były wcześniej przedmiotem tego typu badań.

Doktorant w trakcie realizacji pracy doktorskiej posługiwał się nowoczesnymi technologiami zaczynając od zastosowania ilościowego PCR w czasie rzeczywistym do badań nad ekspresją wybranych genów, po skomplikowane analizy bioinformatyczne przy wykorzystaniu różnych baz danych (TCGA, GEO).

Ponadto, jest to pierwsze doniesienie wskazujące na silny związek ekspresji YRNA1 z zakażeniem wirusem HPV. Mgr Guglas wykazał, że YRNA1 jest najlepszym kandydatem na marker proliferacji nowotworowej w płaskonabłonkowych nowotworach z obszaru głowy i szyi natomiast pozostałe YRNA (YRNA3, YRNA4 oraz YRNA5) nie wykazują specjalnych różnic w ekspresji w komórkach nowotworowych oraz w tkankach pacjentów.

Artykuł nr 1

YRNAs: New Insights and Potential Novel Approach in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Publikacja dotyczyła określenia biologicznej roli YRNA w nowotworach głowy i szyi. Analizowano w niej poziom ekspresji różnych YRNA oraz ich przydatność jako potencjalnych markerów HNSCC. Stosując ilościową odwrotną transkrypcję (qRT)-PCR, zmierzono poziom ekspresji YRNA w liniach komórkowych HNSCC, w 20 dopasowanych tkankach nowotworowych i 70 FFPE (tkanka zatopiona w parafinie w formalinie) od pacjentów ze stwierdzonym HNSCC.

Wykorzystując dane TCGA (The Cancer Genome Atlas) przeprowadzono analizę poziomu ekspresji wybranych genów oraz parametrów kliniczno-patologicznych. Ekspresję poziomu YRNA analizowano za pomocą analizy wzbogacania zestawu genów (GSEA). Wykazano, że ekspresja YRNA1 i YRNA5 jest obniżona w liniach komórkowych HNSCC oraz co ważniejsze pokazano, że poziom YRNA1 jest znacząco obniżony w guzach pacjentów i pozwala na odróżnienie tkanki zdrowej od nowotworowej, a pacjenci ze średnią lub wysoką ekspresją YRNA1 wykazywali lepsze wyniki przeżycia.

Analiza danych TCGA wykazała także, że ekspresja YRNA1 była znacząco zmieniona w przypadku zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV).

Główny wniosek tej pracy jest taki, że YRNA1 może być wykorzystany jako biomarker HNSCC, ale należy przeprowadzić więcej badań aby zweryfikować te obserwacje za pomocą innych modeli badawczych.

Artykuł nr2

YRNAs and YRNA-Derived Fragments as New Players in Cancer Research and Their Potential Role in Diagnostics

Jest to praca przeglądowa, w której opisany został aktualny stan wiedzy na temat wszystkich YRNA, ich funkcja, udział w kancerogenezie, rola w diagnostyce nowotworów i potencjalne zastosowanie jako biomarkery proliferacji nowotworowej.

Artykuł nr 3

The Impact of YRNAs on HNSCC and HPV Infection

Publikacja opisuje rolę YRNA w rozwoju raka płaskonabłonkowego głowy i szyi u młodszych pacjentów przy równoczesnym zakażeniu wirusem HPV. W tym przypadku korzystano ze zbiorów danych dotyczących ekspresji genów z tkanki HNSCC, gdzie wzory ekspresji YRNA w próbkach HPV(+) i HPV(-) w HNSCC różniły się znacząco.

Wykorzystano także badania na liniach komórkowych HNSCC traktowanych plazmidem wykazującym nadekspresję YRNA1. Wyizolowane RNA wykorzystano do przeprowadzania analizy NGS.

Wykazano, że ekspresja YRNA była powiązana głównie z bardziej zaawansowanymi stadiami nowotworu w grupie HPV dodatnich pacjentów i dotyczyła przede wszystkim YRNA3 i YRNA1.

Uzyskane wyniki podkreślają duży potencjał grupy YRNA jako potencjalnych biomarkerów w płaskonabłonkowych nowotworach obszaru głowy i szyi, i że mogą one stanowić nowe cele molekularne.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska świadczy o dojrzałości naukowej Doktoranta. Uzyskane wyniki badań znacznie poszerzają wiedzę na temat YRNA i ich znaczenia w rozwoju raka płaskonabłonkowego głowy i szyi. Praca została przygotowana i zredagowana poprawnie. Badania zaprezentowane w publikacjach z cyklu zostały zaplanowane i przeprowadzone właściwie, a uzyskane wyniki są bardzo wiarygodne. Doktorant jednoznacznie wykazał, że posiada odpowiedni warsztat i jest gotowy rozpocząć nowy etap pracy naukowej.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr. Kacpra Gugłasa oceniam wysoko. Praca ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, które może stanowić cenne źródło informacji do rozwijania dalszych prac w tej tematyce badawczej. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym i wnioskuję do Wysockiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana mgr Kacpra Gugłasa do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Prof. dr hab. Eliza Wyszko