

Łódź, dnia 03.10.2023r.

*prof. dr hab. n. med. Agnieszka Piastowska-Ciesielska*

Zakład Hodowli Komórkowych i Analiz Genomowych  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
90-752 Łódź, ul. Żeligowskiego 7/9

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

Pani mgr Moniki Górskiej-Arcisz - **FGFR2 w regulacji współzależności p62/Keap1/Nrt-2  
znaczenie w luminalnym raku piersi**, wykonanej pod kierunkiem

dr hab. Rafała Sądeja prof. uczelni w Zakładzie Enzymologii i Onkologii Molekularnej  
Katedry Biotechnologii Medycznej MWB UG i GUMed.

#### **Podstawa formalna recenzji**

Podstawę formalną opracowania recenzji stanowi decyzja Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego podjęta w dniu 29 czerwca 2023 roku.

#### **Ogólna charakterystyka i układ przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej**

Rozprawa doktorska przedstawiona do recenzji jest pracą o typowym układzie monografii. Liczy 133 stron wydruku komputerowego a jej struktura jest czytelna, podział na poszczególne części prawidłowy i logiczny. Konstrukcja pracy jest tym samym prawidłowa i spełnia wszystkie wymagania stawiane tego typu dysertacjom.

Spis treści, streszczenie, abstract i wykaz skrótów poprzedzają obszerny 28 stronicowy **wstęp**. Który został podzielony na cztery rozdziały z których każdy ma podrozdziały (od dwóch do sześciu). Pierwszy z rozdziałów poświęcony jest rakowi piersi – epidemiologii, etiologii, klasyfikacji i leczeniu. Rozdział drugi dotyczy mikrośrodowiska guza, jego roli i znaczeniu w rozwoju nowotworów. Autorka omawia w nim również rolę fibroblastów (CAFs), receptorów dla

czynników wzrostu fibroblastów (FGFR) oraz ścieżki sygnalizacyjnej FGF/FGFR. Jak również rolę FGFR2 w raku piersi oraz inhibitorów FGFR. Trzeci rozdział wstępu poświęcony jest autofagii. Znajdujemy tutaj szeroki opis mechanizmów regulacji tego procesu jak również jej rolę w rozwoju nowotworów i oporności na stosowane terapie. Rozdział czwarty poświęcony czynnikiowi transkrypcyjnemu Nrf-2, omówiono jego budowę, funkcję, regulację oraz rolę w transformacji nowotworowej i oporności na stosowane terapie.

**Cel.** Jak wskazała autorka głównym celem projektu była ocena udziału FGFR2 w regulacji współzależności p62/Keap1/Nrf-2 oraz określenie jej znaczenia w luminalnym raku piersi.

Realizowany projekt podzielono na etapy którym towarzyszyły następujące cele:

1. ocena udziału FGFR2 w regulacji procesu autofagii,
2. poznanie FGFR2-zależnego mechanizmu molekularnego regulacji autofagii,
3. ocena współzależności FGFR2/autofagia dla wzrostu i odpowiedzi komórek rakowych na leki anty-ER (tamoksyfen oraz fulwestrant),
4. zbadanie współzależności FGFR2-zależnej na regulację kompleksu Keap1/Nrf-2,
5. ocena współzależności FGFR/Nrf-2 dla wzrostu i odpowiedzi komórek raka piersi na terapię anty-ER,
6. opracowanie potencjalnej wartości prognostycznej zależności FGFR/Nrf-2 przy pomocy analiz *in silico* w oparciu o materiał kliniczny pochodzący od pacjentek z luminalnym A rakiem piersi.

**Materiały** – na 15 stronkach autorka szczegółowo wymienia wszystkie wykorzystane w trakcie realizacji projektu materiały, począwszy od linii komórkowej, pożywek hodowlane poprzez bufory, inne odczynniki, przeciwciała kończąc na sprzęcie laboratoryjnym jaki wykorzystywała w trakcie realizacji projektu.

**Metody** – to 8 stron precyzyjnego opisu wykorzystanych narzędzi badawczych. W mojej opinii jest to bardzo istotna część każdej rozprawy gdyż pokazuje warsztat badawczy jakim posługiwał się Doktorant. Bardzo wysoko oceniam tą stronę przedstawioną do oceny rozprawy. Należy podkreślić, że tak bogaty i zróżnicowany panel zastosowanych metod badawczych pozwolił na wielowątkowy wgląd w próbę oceny udziału FGFR2 w regulację badanych zależności i ich znaczenia w luminalnym raku piersi. Tak zaplanowana metodyka badań wymagała ze strony Doktorantki dużego osobistego zaangażowania w opanowanie zastosowanych technik

badawczych oraz niezbędnego czasu na ich doskonalenie w toku realizacji założonych celów. Świadczy to również, o wszechstronnym technicznym przygotowaniu Doktorantki do pracy laboratoryjnej. Z obowiązku recenzenta poproszę Doktorantkę o uściślenie kilku informacji:

Podrozdział 4.6. Western blotting. Używane jest sformułowanie „całonocny transfer”, „całonocna inkubacja membran” – czy było to 12 godzin czy może 8 godzin?

Podrozdział 4.7. Hodowle trójwymiarowe (3D). Napisano, że po inkubacji do dołków dodawano 800µl pożywki hodowlanej suplementowanej FGF7 (50ng/ml) i heparyną (50ng/ml). W jakim celu podawano heparynę i dlaczego w pozostałej części pracy (wyniki) nie jest ona uwzględniana? Przykładowo na stronie 66 wyników omawiany jest jedynie wpływ FGF7 i inhibitorów ale nie heparyny.

Podrozdział 4.8. Test proliferacji (MTT). Czy w opinii Doktorantki MTT jest testem rzeczywiście oceniającym proliferację? Jak jest uzasadnienie do zamiennego używania słowa żywotność i proliferacja przy tej metodzie?

**Wyniki** na 39 stronach Doktorantka w sposób przejrzysty zaprezentowała wyniki swojej pracy. Ta część pracy podobnie jak poprzednie podzielona jest na podrozdziały których układ ten jest chronologicznym odzwierciedleniem kolejnych etapów realizacji badań. Dzięki temu czytelnik jest płynnie prowadzony przez cały proces badawczy. Liczne ryciny również ułatwiają śledzenie uzyskanych wyników co jest istotne z uwagi na znaczną obszerność tej części rozprawy. Z obowiązku recenzenta pragnę zapytać dlaczego jedynie przy części rycin (10,11,20,22,23,24) pojawia się informacja, że prezentowane dane są średnimi wartościami  $\pm$  SD (n=3)? Dlaczego na rycinach prezentujących wyniki uzyskane metodą Western blot nie pokazano wzorca masy?

**Podsumowanie** – odzwierciedla założone cele projektu.

**Dyskusja** – na 11 stronach Doktorantka w sposób rzetelny poddaje analizie, konfrontacji uzyskane wyniki w stosunku do doczasowej wiedzy. Czy w kontekście wyników opisanych na stronie 104 dotyczących korelacji genów Doktoranta planuje powtórzenie/weryfikację wyników na poziomie białka?

**Literatura** Zasadniczą część pracy wieńczy spis literatury, obejmujący 208 rzetelnie dobranych pozycji anglojęzycznych pochodzące z czasopism indeksowanych JCR o istotnym wskaźniku wpływu IF.

Jako źródło finansowania badań wskazano projekty:

2020/37/N/NZ3/01401 Aktywność FGFR2 w regulacji czynnika transkrypcyjnego Nrf-2 –  
znaczenie dla wzrostu i odpowiedzi komórek luminalnego raka piersi na terapię anty-ER

kierownik Monika Górska

2017/27/B/NZ3/01474

Rola FGFR2 w regulacji autofagii w raku piersi - znaczenie prognostyczne

kierownik dr hab. Rafał Sądej

### **Oryginalność, aktualność i przydatność podjętego problemu naukowego**

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem wśród kobiet na świecie (1.7 miliona nowych zachorowań/rok). Szacuje się że 50-60% wszystkich stanowi podtyp luminalny A, charakteryzujący się obecnością receptorów estrogenu i progesteronu (ER+/PR+). Wieloletnie wysiłki badawcze zaowocowały wprowadzeniem spersonalizowanych terapii, ukierunkowanych między innymi na aktywność ER, co miało niebagatelne znaczenie dla chorych. Jednak naturalna zdolność komórek nowotworowych do wymykania się nawet tak precyzyjnym narzędziom u większość pacjentów z czasem prowadzi do oporności na stosowany lek w tym anty-ER. Nasza obecna wiedza w zakresie biologii nowotworów obliguje nas do szerszego spojrzenia i uznania, że mikrośrodowisko guza, odgrywa istotną rolę w progresji nowotworów i być może przyczynia się do niepowodzenia stosowanych obecnie terapii. Powinniśmy również większą uwagę poświęcić między innymi temu w jaki sposób komórki wykorzystując klasyczne ścieżki metaboliczne w tym degradacji zbędnych białek i elementów komórkowych nabywają oporności na leki.

W mojej opinii Doktoranta podejmując się próby oceny udziału jednego z pośredników oddziaływań pomiędzy komórkami nowotworowymi guza a jego mikrośrodowiskiem w raku piersi jakim jest FGFR2 (receptor dla czynników wzrostu fibroblastów typu 2) wpisuje się aktualny kierunki badań. A uzyskane wyniki wskazujące, że regulowana przez sygnalizację FGFR2 współzależności p62/Keap1/Nrf-2 ma istotny wpływ na odpowiedź komórek luminalnego raka piersi na terapię anty-ER jest oryginalnym wynikiem o istotnym potencjale do rozwoju nowych schematów terapeutycznych.

Tym samym uważam, że przedstawiona do recenzji dysertacja jest pracą aktualną odpowiadającą na bieżące potrzeby, oryginalną o potencjalnie istotnym aspekcie praktycznym.



## **Podsumowanie**

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko, jest to starannie przeprowadzone bardzo żmudne i czasochłonne badanie. Rozprawa jest napisana w sposób czytelny a koncepcja i sposób zaprojektowania badań, oraz ocena uzyskanych wyników nie budzą wątpliwości. Uzyskane wyniki stanowią cenny wkład do dotychczasowej wiedzy. Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą w tematyce rozprawy doktorskiej i zrealizowała założone cele badawcze uzyskując oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Należy tutaj podkreślić, że poszczególne doświadczenia wykonano w wymaganej ilości powtórzeń, a uzyskane wyniki były starannie zanalizowane pod względem istotności statystycznej i zilustrowane na odpowiednich wykresach, fotografiach i schematach. Doktorantka świetnie dała sobie radę z interpretacją otrzymanych wyników, co wynikało nie tylko z dobrej jakości zamieszczonych w rozprawie ilustracji, ale także z wiedzy teoretycznej i praktycznej zdobytej w trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej.

## **Wnioski końcowe**

Stwierdzam, że rozprawa spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. **W związku z powyższym mam zaszczyt przedłożyć wniosek o dopuszczenie mgr Moniki Górskiej-Arcisz do dalszych etapów postępowania doktorskiego.**

**Jednocześnie, biorąc pod uwagę szeroki zakres przeprowadzonych badań jak i wartość merytoryczną uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.**