



Wrocław, 5.05. 2023

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Sochackiej pt. „Rola
neuromedyny U (NMU) w regulacji potencjału migracyjnego komórek
raka jelita grubego”**

Rak jelita grubego (RJG) jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów na świecie. Pomimo rozwoju wiedzy dotyczącej etiologii RJG oraz istnienia szeregu strategii terapeutycznych stosowanych w jego leczeniu, problem nie jest rozwiązany. Istnieje zatem ciągła potrzeba poszukiwania nowych celów molekularnych, które mogłyby znacząco poprawić zarówno skuteczność metod diagnostycznych, jak i terapeutycznych.

Dlatego też podjęcie badań zmierzających do identyfikacji cząsteczek, których aktywność jest wykrywalna u pacjentów cierpiących na raka jelita grubego we wczesnych stadiach choroby ma pełne uzasadnienie.

Praca doktorska pani mgr Eweliny Sochackiej włącza się w nurt tego typu badań. Koncentruje się bowiem na roli białka wydzielniczego neuromedyny U (NMU) oraz jej receptorów (NMUR1 i NMUR2) w rozwoju raka jelita grubego.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została wykonana pod promotorstwem dr hab. Joanny Bonceli, prof. IBM PAN oraz promotorstwem pomocniczym dr Patrycji Przygodzkiej z Instytutu Biologii Medycznej PAN.

Oceniana przeze mnie praca liczy 109 stron, w tekście zamieszczono 19 rycin, 11 tabel i cytowano 126 pozycji literaturowych. Warto podkreślić, że wśród zacytowanych prac ponad 50% pochodzi z ostatnich pięciu lat, co świadczy o aktualności podejmowanego tematu.

Rozprawa doktorska mgr Eweliny Sochackiej ma układ typowy dla tego typu opracowań. W 29 stronicowym „Wstępie” Autorka przedstawiła informacje przybliżające temat i ułatwiające czytelnikowi zrozumienie całości pracy. W tej części Doktorantka zamieszcza dane dotyczące molekularnych postaw rozwoju RJG, metod diagnostycznych i terapeutycznych stosowanych w tej jednostce chorobowej. Skupia również uwagę na kwestiach bardziej ogólnych z obszaru biologii nowotworów, dotyczących migracji komórek nowotworowych czy też tranzycji epitelialno-mezenchymalnej zachodzącej w czasie progresji. Kluczowa część tego rozdziału dotyczy jednak aktualnego stanu wiedzy na temat neuromedyny U, jej receptorów oraz przekaźnictwa sygnału za pomocą tych cząsteczek. Zakres informacji zawartych we wstępie jest adekwatny do opisanych później wyników, nie zawiera zbędnych wątków i, co ważne, w sposób ukierunkowany wprowadza czytelnika w temat.

Głównym celem eksperymentów prowadzonych w ramach ocenianej przeze mnie pracy doktorskiej jest ocena roli NMU w progresji raka jelita grubego. Materiał do badań stanowiło siedem linii komórkowych – sześć linii RJG zróżnicowanych fenotypowo oraz linia nabłonka jelita grubego używana jako kontrola. Część badań była ponadto prowadzona na wygenerowanych w czasie realizacji pracy doktorskiej liniach HT29 i Caco-2 ze stabilną nadekspresją genu *NMU*.

Do realizacji sformułowanego celu Doktorantka zastosowała techniki biologii molekularnej oraz szereg metod służących określeniu aktywności badanych komórek w kontekście sygnalizacji za pomocą neuromedyny i jej receptorów, takich jak testy migracji, inwazji i klonogenności, cytometria przepływowa, immunoprecypitacja czy Western blotting.

Techniki wykorzystane przez panią mgr Ewelinę Sochacką są adekwatne do wytyczonych zadań i opisane z odpowiednią szczegółowością w części „Materiały i Metody”. Mam do tej części niewielkie zastrzeżenia. Znaczna część stosowanych w pracy technik opierała się o zastosowanie przeciwciał, których wykaz znajduje się w podrozdziale 3.1.3. Brakuje w nim jednak informacji czy używane przeciwciała były mono- czy poliklonalne, bądź numeru katalogowego, pod którym znajduje się ich szerszy opis. Jest to istotne szczególnie w odniesieniu do przeciwciał skierowanych przeciwko neuromedynie U. Kolejną moją uwagą do tej części pracy jest wielokrotne, nieprawidłowe opisanie prędkości wirowania – zamiast np. 1000 g winno być raczej 1000 x g, gdzie „g” oznacza przyspieszenie nie jednostkę masy czyli gramy.

Najbardziej interesująca część rozprawy doktorskiej to oczywiście 20-stronicowy rozdział „Wyniki”, w którym można wyróżnić dwie części. Rezultaty umieszczone w pierwszej części dotyczą charakterystyki panelu linii komórkowych raka jelita grubego pod względem ekspresji genów oraz poziomu neuromedyny U oraz jej receptorów. Doktorantka wykazała, że w zależności od fenotypu, komórki RJG cechuje zróżnicowana ekspresja genów wymienionych białek. Ponadto ustaliła, że neuromedyna jest wydzielana do środowiska komórkowego, m.in. za pomocą mikropęcherzyków. Pani Sochacka udowodniła również, że ekspresja genów dla receptorów NMUR1 i NMUR2 jest regulowana w komórkach analizowanych linii poprzez proces metylacji. Wreszcie, że sygnalizacja komórkowa generowana przez NMU ma wpływ na mobilizację wewnątrzkomórkowego wapnia oraz aktywację kinazy ERK.

Druga część wyników pracy doktorskiej została przeprowadzona z zastosowaniem linii komórkowych z nadekspresją *NMU* i pozwoliła na ustalenie, że przekaźnictwo sygnału stymulowanego przez neuromedynę U prowadzi do zwiększenia potencjału migracyjnego i inwazyjnego komórek raka jelita grubego.

Eksperymenty przeprowadzone w przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej są logicznie zaplanowane i w sposób przekonujący zaprezentowane. Na tym etapie oceny pracy doktorskiej chciałabym wyrazić wątpliwości w następujących kwestiach, do których, mam nadzieję, odniesie się Doktorantka w czasie publicznej obrony.

1. W rozdziale 4.4. Wyników, dotyczącym oceny poziomu *NMU* w mikropęcherzykach, na rycinie 7A jest przedstawiony reprezentatywny blot. Wielokrotność powtarzanych eksperymentów ma istotny wpływ na poprawność sformułowanych wniosków. Dlatego chciałabym uzyskać informację na temat liczby powtarzanych analiz metodą Western Blotting. Takich informacji brakuje również w opisie rycin 12 i 13.

2. Z przedstawionych przez Doktorantkę analiz wynika, że stymulacja komórek RJG przez neuromedynę U podwyższa ich zdolności migracyjne i inwazyjne. Takich efektów nie obserwuje się w przypadku testu formowania kolonii. Czy mogłabym poprosić Doktorantkę o komentarz takiego zróżnicowanego „zachowania się” komórek?

Ostatnią częścią ocenianej przeze mnie pracy jest „Dyskusja”, w której Autorka omawia syntetycznie uzyskane przez siebie rezultaty, odnosząc je do istniejącej wiedzy

dotyczącej aktywności neuromedyny U i jej receptorów w różnych typach nowotworów. Jest to część interesująca i podobnie jak poprzednie rozdziały zwięzła i syntetyczna. To bardzo duży walor pracy doktorskiej pani mgr Eweliny Sochackiej.

Oceniana przeze mnie praca doktorska została napisana poprawną polszczyzną i starannie opracowana pod względem edytorskim, z wyjątkiem wspomnianych wcześniej drobnych kwestii, które nie mają wpływu na moją ocenę pracy.

Analizując dorobek publikacyjny pani mgr Eweliny Sochackiej stwierdzam, że jest Ona współautorką pięciu publikacji, w tym dwóch dotyczących tematyki pracy doktorskiej. W jednej z nich, opublikowanej w czasopiśmie z listy JCR - J. Exp. Clin. Cancer Res. udział Doktorantki jest wiodący. Publikacja ta zawiera część wyników zaprezentowanych w pracy doktorskiej.

Reasumując, rozprawę doktorską pani mgr Eweliny Sochackiej oceniam bardzo wysoko i stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Wnoszę zatem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie pragnę podkreślić, że wyniki zawarte w ocenianej przeze mnie pracy doktorskiej zawierają istotne walory poznawcze i aplikacyjne. W moim przekonaniu Autorka uzyskała interesujące wyniki, które po raz pierwszy pokazują związek neuromedyny U i jej receptorów z progresją raka jelita grubego. Uzyskane w pracy dane są bardzo dobrze udokumentowane. Mogą się one przyczynić do wskazania NMU jako czynnika prognostycznego w przypadku raka jelita grubego. Warto również podkreślić, że część zaprezentowanych wyników została opublikowana w renomowanym czasopiśmie z listy JCR, którego aktualny IF wynosi 12, 658 (140 pkt ministerialnych). Biorąc wszystko pod uwagę zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej pani mgr Eweliny Sochackiej stosowną nagrodą.

