

dr hab. Antonina Mazur  
[antonina.mazur@uwr.edu.pl](mailto:antonina.mazur@uwr.edu.pl)

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Wróbla  
pt.: „Rola komórek CD44<sup>high</sup> w mikroewolucji lekooporności komórek raka prostaty  
indukowanej przez fenofibrat”  
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jarosława Czyży  
w Zakładzie Biologii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii  
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy badań podstawowych nad mikroewolucją komórek raka prostaty w kontekście jednej z ich cech, jaką jest lekooporność. Rak prostaty jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów wśród mężczyzn zarówno w Polsce, jak i na Świecie. Niestety, odsetek pacjentów umierających z powodu tej choroby jest wciąż wysoki, co uzasadnia prowadzenie badań podstawowych, mających na celu zrozumienie etiopatogenezy tego typu nowotworu. Wiele uwagi poświęca się aktualnie dokładnemu poznaniu mechanizmów odpowiedzialnych za nabywanie przez komórki nowotworowe oporności na różnego typu terapie przeciwnowotworowe. Szczególną rolę w promocji i progresji nowotworu pełnią nowotworowe komórki macierzyste (ang. *cancer stem cells*, CSCs). Zrozumienie ich funkcjonowania i sposobu, w jaki pozwalają tkance nowotworowej przetrwać leczenie pacjenta, są kluczowe dla opracowania skuteczniejszych schematów diagnostycznych oraz terapeutycznych. Badania przeprowadzone przez mgr Tomasza Wróbla wpisują się bardzo dobrze w ten nurt.

Rozprawa doktorska, obejmująca 112 stron, ma typowy układ dla tego typu prac. Jest podzielona na następujące rozdziały: **Wstęp**, **Cele pracy**, **Materiały i metody**, **Wyniki**, **Dyskusja**,



**Podsumowanie i wnioski** oraz **Literatura**. W pracy znajdują się ponadto **Streszczenia** w językach polskim oraz angielskim, a także **Wykaz skrótów**.

W **Wykazie skrótów** brakuje wytłumaczenia skrótu „WT”. Dodatkowo przy części skrótów brakuje ich rozwinięcia w języku polskim. Dwustronicowe **Streszczenia** w języku polskim oraz angielskim zostały prawidłowo zredagowane i zawierają wszystkie najważniejsze elementy rozprawy.

**Wstęp** został bardzo dobrze napisany, co powoduje, że czyta się go płynnie. Znajdują się w nim informacje dotyczące powstawania nowotworu, biologii raka prostaty oraz diagnostyki i leczenia pacjentów z tym rodzajem nowotworu. Dostajemy także informacje na temat CSCs oraz sposobu ich detekcji oraz izolacji. Zabrakło tutaj jednakże dokładnego opisu skali Gleasona (str. 30), która służy do oceny stopnia zaawansowania choroby nowotworowej. Doktorant podaje charakterystykę guzów stopni 1-3 oraz 4-5 oraz tych guzów, którym przypisuje się 10 punktów. Czy należy rozumieć, że każdy stopień ma dodatkowo podklasyfikację, a więc guzy stopnia 5 mogą mieć przypisanych 10 punktów? Czy mogłabym prosić o omówienie tej skali podczas obrony? Prosiłabym również o wytłumaczenie czym jest „post-EMT” (str. 34). W wielu miejscach **Wstępu** brakuje odniesień literaturowych do przytaczanych informacji, dotyczy to całych paragrafów, np., na stronach 14, 15, 17, 20 czy 22 (cały podrozdział). Nie rozumiem także, dlaczego w jednym podrozdziale znajduje się podsumowanie, natomiast w innych podrozdziałach **Wstępu** nie ma analogicznych podsumowań. Wydaje mi się, że wyszczególnianie w postaci osobnego podrozdziału podsumowania informacji na temat sposobu izolacji CSCs nie było konieczne. Pomijając ww. kwestie, uważam, że ta część rozprawy zasługuje na pochwałę.

W kolejnym rozdziale pracy Doktorant jasno nakreśla, jakie **Cele** przyświecały jego pracy. Główny cel Doktoranta jest odzwierciedlony w tytule rozprawy doktorskiej.

W rozdziale **Materiały i metody** wymienione zostały użyte w pracy materiały oraz opisane dość wyczerpująco protokoły poszczególnych eksperymentów. Niezbyt dobrym zabiegiem w tej sekcji było zamieszczenie tabel w postaci osobnych podrozdziałów bez żadnego zdania wprowadzającego. To poskutkowało umieszczeniem słowa „tabela” w tytułach trzech podrozdziałów tej sekcji. Czy mogłabym prosić o podanie informacji w czym był rozpuszczony formaldehyd stosowany w barwieniach immunocytochemicznych? W podrozdziale 3.2.2.1 Doktorant opisuje, w jaki sposób analizował tempo proliferacji komórek. Nie jestem pewna, czy można uznać, że spadek bądź wzrost liczby komórek po podaniu docetakselu (DCX) i fenofibratu (FF) świadczy o tempie proliferacji. Moim zdaniem zmiana w liczbie traktowanych komórek w porównaniu do komórek kontrolnych świadczy o ich przeżywalności, bądź wypadkowej ww. procesów w badanych warunkach. Ta uwaga odnosi się także do interpretacji wyników pokazanych na rycinie 27 (str. 80).

W części **Wyniki** Autor właściwie przedstawia rezultaty swoich badań, które w znakomitej większości zostały opublikowane. Uzyskane przez Doktoranta wyniki są wartościowe i przyczyniają się do lepszego zrozumienia roli, jaką pełnią CSCs albo komórki podobne do macierzystych (ang. *stem-cell like*, SCL) w nabywaniu lekooporności przez komórki raka prostaty. Mam do Doktoranta kilka pytań odnośnie wyników, mam też kilka zastrzeżeń do tej części rozprawy. Chciałabym się dowiedzieć, dlaczego populacja komórek Nanog<sup>+</sup> nie została policzona (Ryc. 7). Domyślam się, że nie jest możliwym wyizolowanie tej frakcji komórek w celu jej propagacji, ponieważ jest to białko wewnątrzkomórkowe. Ale oszacowanie liczby komórek Nanog<sup>+</sup> / Oct3/4<sup>+</sup> w izolowanych frakcjach komórek i ich potomstwie byłoby ciekawym wynikiem. W **Materiałach i metodach** oraz **Dyskusji** parę razy odniesiono się do komórek Oct3/4<sup>+</sup>, ale w **Wynikach** znajduje się tylko jedna rycina pokazująca analizę obecności ww. markera w badanych komórkach, dotyczy to wielojądrzastych komórek olbrzymich (ang. *polyploid giant cancer cells*, PGCC) (Ryc. 22C). Natomiast w kilku miejscach w **Dyskusji** jest napisane, że identyfikowano obecność białka Oct3/4 w izolowanych komórkach. Czy te wyniki nie zostały pokazane w rozprawie? Czy też ww. odniesienia za każdym razem dotyczą ryciny 22C? Doktorant wspomina (str. 54), że po pewnym czasie po izolacji komórek SCL ich potomstwo nabywało fenotyp CD133<sup>low</sup>/CD44<sup>low</sup>, jednakże te wyniki nie zostały pokazane. Czy można byłoby się dowiedzieć, po jakim czasie hodowli potomstwo izolowanych komórek traciło markery CD44 i CD133? Ciekawi mnie także, czy została oszacowana liczba komórek o fenotypie SCL po tym czasie w potomstwie izolowanych komórek o fenotypie CD44<sup>high</sup> albo CD133<sup>high</sup> albo CD44<sup>high</sup>/CD133<sup>high</sup>.

Czasami brakuje kompletu rezultatów dla danej populacji komórek bądź pokazane są niekompletne wyniki. Na przykład na rycinie 8C pokazane są wykresy kołowe oraz korelacyjne dla komórek nSCL i dSCL, ale nie dla komórek DU145, natomiast na wykresie obok pokazano słupki dla wszystkich trzech populacji komórek. Taka sama uwaga dotyczy ryciny 9A. Z kolei na rycinie 16 w części B prędkość przemieszczania się komórek została pokazana dla komórek traktowanych FF albo DCX albo FF + DCX, natomiast w części C tej samej ryciny pokazano analizy rozkładu populacji komórek apoptotycznych oraz nekrotycznych tylko dla dwóch warunków (FF oraz FF + DCX), brakuje tutaj rezultatów dla komórek traktowanych samym DCX. Wiem, że te wyniki zostały pokazane na rycinach 9C i 12C, ale przedstawienie wyników dla wszystkich warunków na rycinie 16 znacznie ułatwiłoby interpretację uzyskanych rezultatów. Czy mogłabym prosić o odniesienie się do ryciny 10C podczas obrony? Nie została ona omówiona w podrozdziale 4.1.4. Wynik dla komórek dSCL (Ryc. 8A) nie został opisany w rozdziale 4.1.2. Brakuje mi także policzenia komórek (Ryc. 15B) oraz zdjęć komórek (Ryc. 15C) poddanych działaniu samego FF. Nie została także przeprowadzona analiza rozkładu komórek apoptotycznych oraz nekrotycznych dla linii PC-3 oraz PC-3\_DCX20 traktowanych

DCX albo FF + DCX (podrozdział 4.3). Czy wyniki przedstawione na rycinie 28D były poddane analizie statystycznej? W legendzie do tej ryciny jest adnotacja o tym, ale nie ma informacji o istotności statystycznej. Dodatkowo w opisach niektórych rycin brakuje informacji o zastosowanym teście do analizy statystycznej (np. ryciny 11D, 15D oraz 16B). Dodatkowo nie wszystkie linie przerywane na wykresach zostały wytłumaczone (np. rycina 11A). Nie ma ryciny 9D, do której Doktorant odnosi się na stronie 66. Domyślam się, że chodzi tutaj o rycinę 9C, prawda? Na stronie 75 znajduje się odniesienie do ryciny 9B, która dotyczy liczby komórek badanych sublinii traktowanych DCX w różnych stężeniach, natomiast Doktorant w swoim odniesieniu ma na myśli dezorganizację cytoszkieletu mikrotubularnego.

Niestety nie mogę się zgodzić z wnioskami wysnuwanymi na podstawie obrazów uzyskanych przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej. Przede wszystkim obrazy są zbyt małe, aby można było ocenić, np., liczbę włókienek naprężeniowych bądź liczbę ognisk adhezyjnych. Natomiast Doktorant wielokrotnie pisze o zmieniającej się liczbie tych struktur (np., str. 54 w odniesieniu do ryciny 8B, str. 68 w odniesieniu do ryciny 19A oraz str. 70 w odniesieniu do ryciny 20B). Aby móc wysnuć wniosek dotyczący zmieniającej się liczby ww. struktur, trzeba je jednak policzyć. Doktorant nie przedstawia takich kalkulacji. Należało pokazać przybliżenia wybranych regionów zdjęć, może to by uwiarygodniło interpretację uzyskanych wyników. Patrząc na zdjęcia na rycinie 23D, trudno jest mi uwierzyć, że są różnice w organizacji mikrotubul pomiędzy poszczególnymi warunkami. Nie wiem także, co Doktorant miał na myśli, pisząc o polaryzacji komórek. Nie bardzo widzę różnicę pomiędzy morfologią komórek hodowanych w różnych warunkach, pokazanych na rycinach 13B, 14B, 16A, 18C czy 29A. Czy Doktorant mógłby podczas obrony wytłumaczyć, jak charakteryzuje obecność i brak polaryzacji „przód-tył” komórek? Nie zostały zastosowane żadne markery pozwalające na analizę tego typu polaryzacji. Na stronie 76 jest napisane, że nietraktowane komórki dfSCL\_DU145\_DCX20 CD44<sup>high</sup> mają „nabłonkową” morfologię (Ryc. 25B), natomiast na Ryc. 23D te same komórki w tych samych warunkach nie mają już takiej morfologii. Czy mogłabym prosić o odniesienie się do tej kwestii podczas obrony? Może jest to kwestia różnej konfluencji komórek? Reasumując, nie brałam pod uwagę interpretacji przez Doktoranta eksperymentów opartych na barwieniach immunocytochemicznych. Poza kwestiami formalno-edytorskimi, które omawiam poniżej, nie mam już innych zastrzeżeń do tej części rozprawy.

**W Dyskusji** Autor rozprawy krytycznie odnosi się do uzyskanych wyników i porównuje je z danymi opisanymi w dostępnej literaturze. Ta część rozprawy jest bardzo dobrze napisana. Dobrze, że nie są tutaj powtarzane opisy wyników. Nie mogę się tutaj jednak zgodzić z wnioskiem (str. 92), że nabyty przez komórki nabłonkowy fenotyp przyczynia się do tworzenia przedziałów guza o niskiej dostępności dla DCX/FF, co w dalszej kolejności może prowadzić do regeneracji guza po leczeniu.

Jak pisałam już wcześniej, nie przekonuje mnie zawarta w rozprawie analiza immunocytochemiczna komórek. Pomijając powyższą kwestię, na podstawie lektury tej części rozprawy można wysnuć wnioski o dojrzałości naukowej Doktoranta.

Bardzo dobrym zabiegiem było umieszczenie po Dyskusji rozdziału **Wnioski oraz podsumowanie**. Systematyzuje to najważniejsze osiągnięcia Doktoranta. W tym rozdziale znajduje się także część skupiająca się na tym, co w następnej kolejności powinno zostać zrobione. Podoba mi się, że Doktorant ma przemyślenia na ten temat.

Przechodząc już do oceny rozprawy pod kątem formalno-edytorskim, należy zwrócić uwagę na fakt, że praca została napisana poprawnie pod kątem językowym i jest starannie zredagowana. Pojawilo się w niej zaledwie kilkanaście literówek, drobnych błędów gramatycznych oraz interpunkcyjnych, a także powtórzeń. Głównym moim zastrzeżeniem jest tutaj stosowanie kropek (język angielski) zamiast przecinków (język polski) w ułamkach dziesiętnych na zdecydowanej większości rycin. Zapewne ryciny zostały wzięte z publikacji w języku angielskim i sposób zapisu ułamków dziesiętnych nie został zmieniony. Przeszkadza mi też częste pisanie o potencjale komórek. Nie wiem, o jaki potencjał Doktorantowi chodziło. Czy o potencjał migracyjny, do tworzenia komórek lekoopornych, itd.? Wielokrotnie pojawiają się następujące sformułowania – „Potencjał komórek CD44<sup>high</sup> w populacjach komórek raka prostaty z wyindukowaną lekoopornością” (tytuł podrozdziału 4.2), „Potencjał komórek CD133<sup>high</sup>” (tytuł podrozdziału 4.4), „Obserwacje te potwierdzają potencjał komórek CD44<sup>high</sup>” (str. 56), „W dalszej kolejności zbadano, na ile uniwersalny jest potencjał komórek SCL.” (str. 61), itd. Drobniejsze niedociągnięcia wymieniam poza recenzją.

Doktorant wymienia 175 pozycji w części **Literatura**. Znakomita większość zacytowanych artykułów (ponad 110) pochodzi z ostatnich 10 lat. W kilku przypadkach brakuje informacji o czasopiśmie (poz. 83 i 129) lub numeru doi (poz. 57, 72, 111 i 164). Przy pozycji nr 33 nie ma podanych nazwy czasopisma oraz numeru doi. Pozycje literaturowe zostały prawidłowo dobrane, co świadczy o właściwym przygotowaniu teoretycznym Doktoranta.

Wymienione błędy oraz uchybienia nie wpływają na merytoryczną wartość pracy, która jest wysoka. Recenzowana rozprawa posiada dużą wartość poznawczą. Założone cele zostały w całości zrealizowane. Doktorant wykazał, że w obu badanych liniach komórkowych obecne są komórki SCL, które, gdy są izolowane w obecności DCX, odpowiadają za oporność ich potomstwa względem DCX. Natomiast nie są one w stanie zapewnić oporności swojemu potomstwu na jednoczesne podawanie FF i DCX. Same SCL (CD44<sup>high</sup>) są jednakże bardziej odporne na działanie powyższych związków niż inne badane subpopulacje komórek DU145 i PC-3. Nie napawa to optymizmem, sugeruje to jednak, że warto testować kombinacje różnych inhibitorów przynajmniej w celu przedłużenia życia pacjenta i złagodzenia skutków ubocznych tradycyjnych chemioterapeutyków. Ponadto uzyskane wyniki

sugerują, że należy skupić się przede wszystkim na eliminacji CSC, które, jak wynika z badań Doktoranta, mogą być najprawdopodobniej również generowane z populacji komórek o fenotypie CD44<sup>low</sup>/CD133<sup>low</sup>. Zaprezentowane w rozprawie doktorskiej rezultaty zostały opublikowane w 2020 r. w artykule pt.: „*CD44<sup>+</sup> Cells Determine Fenofibrate-Induced Microevolution of Drug-Resistance in Prostate Cancer Cell Populations*” w czasopiśmie *Stem cells*. Doktorant jest pierwszym autorem tego artykułu. Mniejsza pula wyników została opublikowana w 2019 r. w artykule pt.: „*Fenofibrate Augments the Sensitivity of Drug-Resistant Prostate Cancer Cells to Docetaxel*” w czasopiśmie *Cancers*. W tej pracy Doktorant jest środkowym autorem. Doktorant był też współautorem innych prac, co świadczy o jego dużym zaangażowaniu w realizację projektów prowadzonych w Zakładzie, w którym wykonywał pracę doktorską.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455). **Reasumując, przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr Tomasza Wróbla do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.**

Przykładowe usterki stylistyczne, edytorskie, itd.:

str. 15 i str. 17 „Geny opiekuńcze (ang. *caretaker genes*) to geny, które stabilizują genom poprzez kontrolę mutacji”, „genów naprawiających DNA” oraz „genów hamujących wzrost (*APC, RARβ*), odpowiedzialnych za apoptozę (*DCR1-2, XAF1, TMS1*), a także tych odpowiedzialnych za adhezję (*CDH1*) i szereg innych funkcji (*CD44*, ang. *cluster of differentiation*)” – skróty myślowe albo kalka z języka angielskiego, chodzi tutaj o produkty ekspresji genów;

str. 17 i w wielu innych miejscach „macierz zewnątrzkomórkowa” – powinno być macierz pozakomórkowa;

str. 21 i w kilku innych miejscach „przejście epitelialno-mezenchymalne” – powinno być przejście nabłonkowo-mezenchymalne;

str. 24 „Rzadziej zdarza się, że mutacja inicjująca nowotwór odziedziczona po rodzicach obecna jest już w genomie pluripotencjalnych komórek wężła zarodkowego [...]” - rozumiem kontekst, ale to zdanie brzmi, jakby dziedziczne mutacje mogłyby nie być obecne w genomie rozwijającego się zarodka;

str. 28 zamiast „melanoma” powinno być „czerniak”;

str. 34 „Terapia nowotworów prostaty”, str. 37 „Terapie skojarzone w leczeniu raka; prostaty”, str. 35 „leczenie raka prostaty”, str. 41 „leczenia nowotworu” – leczy się pacjenta, a nie nowotwór, szczególnie to razi, gdy są to tytuły podrozdziałów;

str. 39 „mutacje cytochromu P450”, „mutacje celów terapii”, „mutacja receptora IFN- $\gamma$ ” – mutacje są w genach, a nie białkach, a tym bardziej nie w „celach terapii”;

str. 45 „medium warunkowane” – powinno być „pożywka kondycjonowana”;

str. 48 „ $5 \times 10^3/\text{cm}^2$  lub  $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ ” – tu doszło do pomyłki, powtórzona jest ta sama wartość;

str. 49 „w kanale „FITC” (A4; wzbudzenie GFP – BP470/40; emisja – BP525/50)” – nie wiem, co ma oznaczać „A4”;

str. 54 i 79 „ilość włókien naprężeniowych, „ilość kontaktów zogniskowanych” – powinno być „liczba włókien naprężeniowych” oraz „liczba kontaktów zogniskowanych”;

str. 60 „zdjęcia wizualizacji fluorescencji” - jest to kalka z języka angielskiego;

str. 65 „DCX/FF (10 nM/25 mM)” – powinno być „DCX/FF (10 nM/25  $\mu\text{M}$ )”

str. 60 i 67 w legendzie do rycin 12 oraz 17 liczba N raczej nie wynosi odpowiednio 50000 i 30000, to liczba przeanalizowanych komórek;

str. 68 w legendzie do ryciny 18 zamiast symbolu \* powinien być symbol # przy opisie wartości  $p$ ; przy stężeniach wyrażanych w % nie zamieszczono informacji, czy chodzi o stężenie w/o, w/w czy o/o;

prędkość wirowania Doktorant wyraża w „g”, podczas gdy prawidłowy zapis to „x g”, nie chodzi przecież o gramy;

w różny sposób jest stosowany cudzysłów (często jest to angielska wersja ”...”).