

Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz

Warszawa, 18 września 2023 r.

Kierownik Pracowni Molekularnych
Podstaw Ruchów Komórkowych

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Tomasza Wróbla

pt. "Rola komórek CD44^{high} 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 mi do recenzji rozprawa doktorska mgr. Tomasza Wróbla dotyczy ważkiego zagadnienia poznania mechanizmów lekooporności komórek raka prostaty. Badania Doktoranta doskonale wpisują się w aktualny nurt badań nad opracowaniem skutecznej terapii skojarzonej w oparciu o klasyczne leki przeciwnowotworowe (tu docetaksel) i inne leki/związki, które nie tylko wspomagałyby cytotoksyczne działanie chemioterapeutyków, ale zapobiegałyby także powstawaniu lekooporności (tu fenofibrat). Wyniki uzyskane przez Doktoranta pozbawiają nas jednak optymizmu, gdyż jak się okazuje komórki nowotworowe, a w szczególności ich pula o fenotypie zbliżonym do komórek macierzystych jest zdolna do inicjacji procesu mikroewolucji w kierunku lekooporności na substancje zastosowane w wydawałoby się obiecującej terapii skojarzonej. To bardzo istotne obserwacje, które z pewnością powinny być uwzględnione przez badaczy zajmujących się opracowaniem nowych związków/terapii przeciwnowotworowych i to nie tylko tych skierowanych na zwalczanie raka prostaty.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich, składa się na nią 112 stron, łącznie ze stroną tytułową, podziękowaniami, opisem osiągnięć Doktoranta i spisem treści. Część merytoryczna obejmuje, streszczenia w języku polskim i angielskim, Wykaz skrótów, Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i wnioski oraz Literaturę, to w sumie 105 stron. Wstęp liczy 29 stron i zawiera pięć rycin i cztery tabele. Po przedstawieniu hipotezy badawczej i sprecyzowaniu celów badawczych następuje 10-stronnicowy rozdział Materiały i metody, w którym znajduje się jedna rycina i pięć tabeli. Wyniki liczą 30 stron i zawierają 23 złożone ryciny. Następująca po nich Dyskusja liczy 12 stron, a kolejna część - Podsumowanie i wnioski - liczy dwie strony. Rozprawa kończy się spisem piśmiennictwa (Literatura), na które składa się 175 pozycji, z czego blisko 3/4 to publikacje powstałe w ostatniej dekadzie.

Ocena merytoryczna

Wykaz skrótów w zasadzie jest kompletny, podoba mi się ich rozwinięcie również w języku angielskim; nie zauważyłam błędów w tej części rozprawy, zabrakło mi jednak polskich odpowiedników niektórych skrótów - APC, CCD, Cip1, CX3CL-1, CXCR4, KLF, NANOG, OCT4 i SOX2. Szkoda również, że nie zamieszczono tam oznaczeń dla poszczególnych sublinii badanych komórek.

Wstęp to zwięzłe i zarazem wyczerpujące podsumowanie dotychczasowej wiedzy o epidemiologii i profilaktyce nowotworów, a w szczególności o raku prostaty. Doktorant opisuje także udział komunikacji międzykomórkowej w rozwoju nowotworów, proces mikroewolucji nowotworów oraz sposoby identyfikacji/izolacji nowotworowych komórek macierzystych z wykorzystaniem markerów, w tym białek powierzchniowych CD44 i CD133. Porusza również zagadnienia związane z terapią raka prostaty, w tym z zastosowaniem terapii skojarzonej z wykorzystaniem fenofibratu. Ta część rozprawy jest napisana żywym językiem, bogato ilustrowana, co znacznie ułatwia lekturę. Nie mam zasadniczych uwag, zastanawia mnie jednak powód napisania dwóch rozdziałów poświęconych zagadnieniu terapii nowotworów prostaty - 1.6 i 1.8, przy czym pierwszy zawiera tylko jeden akapit. Za niefortunne uważam również zastosowanie wyrazu *promocja* w odniesieniu do nowotworów (strona 30, pierwsze zdanie w podrozdziale 1.4.2).

W następnej części rozprawy Doktorant przedstawił *hipotezę badawczą*, w której zakłada, że terapia skojarzona oparta o docetaksel (hamuje dynamikę mikrotubul) oraz fenofibrat (bloker metaboliczny) stymuluje klonalną ewolucję komórek CD44^{high}, co prowadzi do przystosowania się populacji komórek raka prostaty do działania obu substancji. Do badań Doktorant wybrał pochodzące od pacjentów linie komórkowe: DU145 (wyprowadzone z przerzutu raka prostaty do mózgu) i PC3 (wyprowadzone z przerzutu raka prostaty do kości) oraz wyprowadzone z nich sublinie odporne na docetaksel (opracowane przez starszego kolegę, dr. Marcina Luty). Weryfikacji hipotezy postanowił Doktorant dokonać poprzez realizację sześciu *celów badawczych*: (i) określenie schematu ekspansji klonalnej potomstwa badanych komórek raka prostaty CD44^{high} (o fenotypie komórek macierzystych, SCL); (ii) analizę roli komórek CD44^{high} w mikroewolucji lekooporności badanych komórek; (iii) określenie wpływu mikroewolucji lekooporności zależnej od komórek CD44^{high} na wrażliwość badanych komórek na fenofibrat na poziomie populacyjnym; (iv) analiza wpływu fenofibratu na wzór indukowanej docetaksem mikroewolucji komórek raka prostaty zależnej od komórek CD44^{high}; (v) analiza roli komórek CD133^{high} w mikroewolucji lekooporności raka prostaty pod wpływem docetakselu i fenofibratu; oraz (vi) określenie konsekwencji długotrwałej inkubacji komórek w pożywce niezawierającej obu substancji na ich lekooporność i potencjał inwazyjny.

Te ambitne cele Doktorant zrealizował wykorzystując wiele nowoczesnych technik i metod badawczych, wyczerpująco opisanych w rozdziale *Materiały i metody*. Poza rutynowymi hodowlami komórek raka prostaty Autor izolował komórki zawierające wysoki poziom markerów CD44 i CD133, dokonywał analiz fenotypowych, w tym określał ich potencjał klonogenny. Przeprowadzał także analizy immunocytochemiczne oraz analizy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Obrazował również badane komórki i tkanki z wykorzystaniem technik mikroskopowych; analizował też ich morfologię, ruchliwość i zdolność do proliferacji. Przeprowadził także badania z wykorzystaniem myszy SCID, które wykorzystał do określenia potencjału inwazyjnego badanych przez siebie komórek. W tej części rozprawy podał również opis zastosowanych analiz statystycznych.

W rozdziale *Wyniki* Doktorant przejrzyście opisał uzyskane wyniki, co nie było łatwym zadaniem, zważywszy na ogrom uzyskanych danych. Autor krok po kroku wyjaśniał celowość przeprowadzanych doświadczeń, każde z nich podsumowując krótkim komentarzem, co znacznie ułatwiło lekturę. Należy również podkreślić, że uzyskane dane zostały poddane analizie statystycznej, wykonano również niezbędne kontrole.

W toku dobrze zaplanowanych acz żmudnych i pracowitych badań w populacjach badanych typach komórek raka prostaty Doktorant wykazał stałą obecność komórek CD44^{high} i/lub CD133^{high} o fenotypie zbliżonym do komórek macierzystych (SCL). Ta pula komórek była zdolna do różnicowania do komórek z niską zawartością markerów CD44 i CD133., co zdaniem Doktoranta leży u podstaw mikroewolucji klonalnej tych komórek pod wpływem stosowanych chemioterapeutyków.

W kolejnych badaniach Doktorant stwierdził, że populacja komórek CD44^{high} może stanowić źródło lekooporności komórek DU145 i PC-3, co jest szczególnie widoczne w przypadku hodowli komórek w obecności docetakselu – są one wówczas odpowiedzialne za inicjację ewolucji fenotypowej całej populacji w kierunku wzrostu lekooporności. Zaobserwował też, że proces ten nie prowadzi do powstania populacji komórek, które są odporne na jednoczesne działanie docetakselu i fenofibratu.

Doktorant zaobserwował również, że wprawdzie populacja komórek CD44^{high} jest bardziej oporna na jednoczesne podanie docetakselu i fenofibratu, to pula ich komórek potomnych po podaniu obu substancji nie wykazywała większej oporności na ich działanie. Co ciekawe, komórki potomne były bardziej odporne na docetaksel, co zdaniem Doktoranta było skutkiem wyższej aktywności pomp efluksowych. Z kolei komórki potomne komórek CD133^{high} były dużo bardziej wrażliwe na docetaksel i fenofibrat. Doktorant stwierdził także w puli komórek raka prostaty obecność komórek o zmienionej morfologii – były one wielojądrzaste i większe w stosunku do pozostałych, które mogą być odpowiedzialne za powstanie w obecności docetakselu i fenofibratu puli komórek o fenotypie SCL.

Doktorant stwierdził również, że komórki CD133^{high} mogą brać udział w mikroewolucji lekooporności badanych komórek w obecności obu substancji, acz uzyskane przez niego dane wskazują, że mają one raczej charakter pomocniczy, wynikający z ich oddziaływań z pulą komórek CD44^{high}.

Ponadto, Doktorant prowadząc długotrwałą hodowlę komórek opornych docetaksel i fenofibrat zaobserwował, że utraciły one lekooporność i nabyły fenotyp inwazyjny, związany z przejściem epitelialno-mezenchymalnym, co wskazuje, że mikroewolucja lekooporności tych komórek może być odwracalna.

I wreszcie Doktorant przeprowadził badania *in vivo*, które potwierdziły jego obserwacje przeprowadzone na hodowlach komórkowych. Komórki odporne na docetaksel inokulowano myszom SCID, które były następnie traktowane docetakselem, fenofibratem, docetakselem i fenofibratem lub placebo. Zaobserwowano, że wprawdzie guzy, które powstawały w obecności docetakselu oraz kombinacji docetaksel i fenofibratu początkowo były mniejsze, to po ok. dwóch-trzech tygodniach dochodziło do powiększenia ich rozmiarów do tych obserwowanych po podaniu placebo. To bardzo przygnębiająca obserwacja...

Nie mam uwag merytorycznych do *Wyników*, tak jak wspomniałam ilość uzyskanych danych jest imponująca, podoba mi się również sposób ich prezentacji - są one przejrzyste opisane i przedstawione w postaci czytelnych rycin.

W *Dyskusji*, napisanej w formie podrozdziałów, Doktorant odniósł się do swoich obserwacji w oparciu o dane literaturowe, również te uzyskane wcześniej w grupie promotora, prof. Jarosława Czyża. Lektura tej części rozprawy potwierdza moje obserwacje o dojrzałości naukowej Doktoranta, który umiejętnie dyskutuje swoje wyniki, nie stroniąc od krytyki i wątpliwości. I co najważniejsze – wskazuje na kierunki przyszłych badań, co jeszcze dobitniej przedstawił w *Podsumowaniu i wnioskach*. Zabrakło mi tu jednak

zbiorczego przedstawienia wyników – bądź w formie graficznej bądź tabeli; przy tym ogromie wyników przekaz rozprawy byłby dużo bardziej nośny. Liczę, że Doktorant pokusi się o to podczas obrony rozprawy.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr. Tomasza Wróbla ma bardzo dużą wartość poznawczą i niewątpliwie wzbogaca naszą wiedzę o biologii nowotworów. Wskazuje bowiem na złożoność procesów i mechanizmów, które zachodzą w komórkach nowotworowych podczas chemioterapii, co utrudnia opracowanie skutecznych terapii. Recenzując nie tak dawno rozprawę mgr. Marcina Luty wydawać się mogło, że jesteśmy o krok od opracowania nowej strategii skojarzonej leczenia lekoopornych przypadków raka prostaty z wykorzystaniem docetakselu i fenofibratu. A tu okazuje się, że komórki nowotworowe „radzą” sobie z tym problemem uruchamiając procesy mikroewolucji prowadzącej do nabycia lekooporności na stosowane w terapii skojarzonej chemioterapeutyki... Te obserwacje będą z pewnością zauważone przez klinicystów oraz badaczy, którzy opracowują nowe związki i strategie przeciwnowotworowe.

Doktorant właściwie zdefiniował ważki problem badawczy (i kliniczny), uzyskał ogrom interesujących i nowatorskich wyników, które umiejętnie przedstawił i przedyskutował w oparciu o rozległe piśmiennictwo w swojej dziedzinie badań, wskazując na następne zadania i obszary badawcze.

Część wyników Doktoranta została przedstawiona w dwóch artykułach opublikowanych w czasopismach *Cancers* (w 2019 r.) oraz *Stem Cells* (w 2020 r) – tu Doktorant jest pierwszym współautorem. Doktorant jest również współautorem ośmiu innych artykułów opublikowanych w latach 2017-2022 w czasopismach z listy filadelfijskiej, które nie są bezpośrednio związane z tematem rozprawy doktorskiej. Wskazuje na jego duże zaangażowanie w pracę badawczą. Artykuły te są już zauważone przez środowisko naukowe – liczba ich cytowań przekracza bowiem 100.

W recenzji znalazło się kilka krytycznych uwag i komentarzy, pragnę podkreślić, że nie umniejszają one mojej bardzo wysokiej oceny rozprawy.

Rozprawa doktorska mgr. Tomasza Wróbla spełnia warunki określone w Art. 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 późn. zm). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie mgr. Tomasza Wróbla do dalszych etapów przewodu doktorskiego w sprawie nadania mu stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ponadto, zważywszy na wysoką wartość poznawczą recenzowanej rozprawy doktorskiej i jej możliwe implikacje praktyczne, z całym przekonaniem wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną dla Rady Dyscypliny nagrodą.

Maria Jolanta Rędownicz