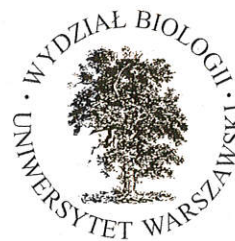




UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych
Zakład Cytologii
prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko



Warszawa, 13 lutego 2020

Recenzja pracy doktorskiej zatytułowanej: „Wpływ fenofibratu na lekooporność raka prostaty” autorstwa Pana mgr. Marcina Lutego.

Praca doktorska Pana mgr. Marcina Lutego zrealizowana została w Zakładzie Biologii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Meritum projektu była analiza reakcji lekoopornych linii komórkowych raka prostaty na skojarzone działanie docetakselu oraz fenofibratu. Kojarzenie dwóch lub nawet większej liczby farmaceutyków o działaniu cytotoksycznym jest testowane w klinice od wielu lat. Terapie opierające się o wykorzystanie jednocześnie leków działających na różne szlaki przekazywania sygnału czy różne ścieżki metaboliczne często dają większe szanse na przedłużenie życia chorego. Bardzo istotnym problem w większości terapii przeciwnowotworowych jest jednak zachodząca podczas ekspozycji na cytostatyki selekcja komórek opornych na jego działanie. W związku z tym niezwykle istotne jest poszukiwanie takich metod leczenia, które ograniczałyby proliferację subpopulacji komórek opornych selekcjonowanych podczas stosowania danego związku chemicznego. W pracy doktorskiej skupiono się na tym problemie i analizowano w jaki sposób fenofibrat może wpłynąć na komórki traktowane docetaksem, w szczególności takie, które stały się odporne na ten lek. Działanie obu związków było już charakteryzowane, jednak o fenofibracie, jako leku przeciwnowotworowym nie wiemy jeszcze wystarczająco dużo. Badania mgr. Marcina Lutego w sposób znaczący przyczyniły się do charakterystyki działania tego związku na komórki nowotworowe. Co istotne zostały one już opublikowane, a więc także poddane krytycznej ocenie recenzentów.

Badania opisane w pracy doktorskiej pan mgr Luty przeprowadził analizując dwie linie komórkowe raka prostaty DU145 oraz PC3. Motywy wyboru tych właśnie linii nie zostały jednak wyczerpująco przedstawione i ograniczają się do podania minimalnych informacji w **Wynikach i Dyskusji**. Autor postawił sobie trzy cele szczegółowe: 1) określenie addytywności działania fenofibratu i docetakselu na dwie linie komórek raka prostaty; 2) opracowanie modelu umożliwiającego wszechstronne analizy wpływu leków na lekooporne komórki prostaty; 3) określenie wpływu fenofibratu

na lekooporność komórek raka prostaty DU145 i PC3 i identyfikacja podłoża tego zjawiska; 4) zbadanie wpływu fenofibratu na wzór mikroewolucji lekoopornych szczepów komórek raka prostaty.

Postawione cele mgr Luty zrealizował przeprowadzając szereg bardzo dobrze zaplanowanych doświadczeń, podczas których wykorzystał liczne techniki współczesnej biologii komórki, biologii molekularnej, czy biochemii. Do metod tych zaliczają się m.in.: hodowle komórkowe, w tym, co niezwykle istotne, uzyskanie lekoopornych szczepów dwóch linii raka prostaty, testy proliferacji, migracji, inwazyjności, immunolokalizacja antygenów, FACS, inhibicja transporterów ABC, spektrometria mas, badanie autofagii i inne. Otrzymane dane poddane zostały odpowiednim analizom statystycznym. Zastosowaniu różnorodnych metod pozwoliło Doktorantowi na opanowanie szerokiego warsztatu biologa komórki.

Wstęp do rozprawy doktorskiej rozpoczyna omówienie zagadnień ogólnych związanych z epidemiologią i profilaktyką, a następnie opisuje etapy rozwoju nowotworów. Centralną część **Wstępu** stanowi charakterystyka prostaty oraz raka prostaty. Na końcu przedstawione są farmaceutyki, które były wykorzystywane przez Doktoranta – docetaksel i fenofibrat. Zwięźle, ale dobrze opisane zostały terapie skojarzone. **Wstęp** zawiera wszystkie informacje istotne dla zrozumienia pracy i świadczy o rozległej wiedzy Autora. W zasadzie podczas analizy tej części pracy nasunęło mi się jedynie jedno pytanie – mianowicie o mechanizm, w jaki białko RB kontroluje aktywność inhibitora p27, czy jest to kontrola "bezpośrednia"? (str. 20).

Materiały i Metody obszernie prezentują wykorzystane odczynniki i zastosowane techniki. W sposób wyczerpujący opisane zostały metody hodowli, w tym uzyskiwania lekoopornych szczepów komórek rakowych, testy lekooporności, analizy proliferacji, migracji itd. Moim zdaniem niepotrzebnie powtarzane były niektóre opisy, takie jak np. analizy mikroskopowe. **Wyniki** zaczynają się od opisu reakcji komórek DU145 na docetaksel i fenofibrat. Charakterystyka polegała na ocenie morfologii, migracji, organizacji cytoszkieletu, inwazyjności (transmigracja przez śródbłonek), komunikacji międzykomórkowej, apoptozy. Następnie analizom poddano komórki lekooporne, uzyskane w wyniku wielokrotnego traktowania docetaksem, wg schematu opracowanego przez Doktoranta. W wyniku tej procedury uzyskano dwie linie komórek DCX_20 i DCX_50. Ich wstępne analizy były analogiczne do tych przeprowadzonych na komórkach DU145. Analizy te rozszerzono, np. o badania także aktywności transporterów ABC. Głównym i najważniejszym zadaniem było jednak stwierdzenie jak badane linie reagują na skojarzone traktowanie docetaksem i fenofibratem i czy ten ostatni związek może sprawić, że lekooporne komórki staną się wrażliwe na docetaksel. Liczne analizy, którym towarzyszyły odpowiednie kontrole, udokumentowały, że tak, dodatek fenofibratu potęgował cytotoksyczne działanie docetakselu, prowadziło to między innymi do obniżenia stężenia ATP w komórkach, wzmocnienia autofagii, indukcji apoptozy, czy nasilenia dezorganizacji cytoszkieletu komórki prowadzące do zaburzeń podziałów. W niektórych doświadczeniach stosowano także inne chemioterapeutki, czy inhibitory blokujące np. działanie transporterów ABC. Bardzo istotną częścią pracy była próba identyfikacji mechanizmu działania fenofibratu na komórki lekooporne. Okazało się, że związek ten uwrażliwia komórki rakowe na działanie leków m.in. hamując transportery ABCB1, prawdopodobnie przez ograniczenie dostępu ATP.

Badania dotyczące lekoopornych komórek DU145 objęły także próbę wyizolowania klonów opornych zarówno na docetaksel jak i na fenofibrat. Zadanie to nie zakończyło się jednak powodzeniem i nie udało się uzyskać takich komórek. Uzyskano jednak klony, które po całej procedurze mogły proliferować jedynie w pożywce bez fenofibratu. Co istotne, te i inne analizy wykazały, że wzrost oporności na

docetaksel sprzyja wzrostowi wrażliwości na fenofibrat. Niektóre analizy powtórzone wykorzystując uzyskane w podobny sposób lekooporne komórki PC3. Podsumowując, przeprowadzone doświadczenia umożliwiły zbadanie podłoża działania fenofibratu na komórki raka prostaty. Wykazały, że zastosowanie tego środka może to być skutecznym wzmocnienie terapii innymi terapeutykami. To odkrycie może mieć bardzo istotne znaczenie aplikacyjne. Ważnym aspektem pracy było także opracowanie metody uzyskiwania lekoopornych komórek nowotworowych.

Osiągnięcia pracy są bezsprzeczne i świetnie podsumowane na str. 119. Ponadto, prowadzone badania doprowadziły do postawienia kolejnych pytań, także o mechanizm działania stosowanych środków. Skrupulatność analiz i ich logika nie zostawia mi przestrzeni na krytykę. Ciekawa jestem natomiast czy możliwe jest, że lekooporne komórki obecne były już w populacji wyjściowej. Jest to wszak ustalona linia komórkowa. I czy próbowano przeprowadzić analizę klonalną pozwalającą na wykazanie czy a jeżeli tak to w jakim odsetku takie komórki były obecne, jeszcze przed cyklem traktowania docetaksem. Czy rozważano też doświadczenia in vivo, podczas których zwierzęta, którym przeszczepiono komórki lekooporne byłyby traktowane stosowanymi związkami?

Wyniki ilustrowane są 34 rycinami. Przedstawiają one wykresy kołowe ilustrujące trajektorię ruchu komórek, zdjęcia komórek wykonane z wykorzystaniem kontrastu modulacyjnego, zdjęcia komórek, w których immunolokalizowano wybrane antygeny, inne wykresy przedstawiające uzyskane dane. Niestety w wielu rycinach ich fragmenty są nieczytelne. O ile na początku i końcu **Wyników** wykresy kołowe mają godziwy rozmiar o tyle środek tego rozdziału obfituje w dokumentację trudną w odbiorze (przykładowo Ryc. 19, str. 73). Wraz z postępem pracy ilustracje ulegają miniaturyzacji a zdjęcia zaciemnieniu (np. Ryc. 28, str. 86). Moimi faworytkami są Ryc. 32C (w kategorii rozmiar zdjęć, str. 91) oraz Ryc. 37 (w kategorii "ciemny obraz", str. 96). Inny problem stanowią podpisy do rycin. Zawierają one i opis materiałów i metod i wnioski płynące z doświadczeń. Natomiast czasem trudno w nich wyłowić opis przedstawionych wykresów czy fotografii. Autor do extremum doprowadził troskę o dobrostan czytelnika i założenie, że rycina i jej opis mają stanowić samo-wyjaśniającą się całość.

W **Dyskusji** wyniki własne zostały skrupulatnie podsumowane i zestawione z istniejącą literaturą dotyczącą problematyki badań. Bardzo dobry jest fragment dotyczący ograniczeń zastosowanego modelu mikroewolucji. Pozostałe części **Dyskusji** cierpią nieco z powodu nadmiernych powtórzeń wyników. Jednak muszę przyznać, że towarzyszące tym powtórzeniom dywagacje są bardzo ciekawe i świadczą o dojrzałości Autora oraz jego krytycyzmie w stosunku do uzyskanych przez siebie danych. Zarówno we **Wstępie** jak i w **Dyskusji** wykorzystana została bogata literatura dotycząca tematyki badań - zacytowano 179 prac. Świadczy to o rozległej znajomości tematu prowadzonych badań.

Praca doktorska napisana jest poprawnym językiem. Czyta się ją wartko, styl jest płynny i pozwolę sobie użyć tego określenia – nieirytujący. Zawiera jedynie nieliczne usterki, niektóre z nich tutaj wymienię. 1) Pisownia zaprzeczonych imiesłówów zmieniła się bardzo dawno temu. Już w 1998 roku SJP wymieniał jako poprawną pisownię łączną. Tak więc „nie będący” (str. 19) od 22 lat piszemy łącznie; 2) Ponadto praca zawiera niezręczności takie jak: „analizy wpływu leków na lekooporność” (str. 41) – leki mają wpływ na lekooporne komórki a nie na lekooporność, „komórki dysocjowano” (str. 52), „licznik komórkowy” (str. 55), komórki "używane równolegle" (str. 75), "oporny na kastrację rak prostaty" (str. 75) i "guz oporny na kastrację" (str. 103), "komórki regenerowały" (str. 94), "inkubacja w .. stężeniu" (str. 97) czy inkubacja "w obecności rosnących stężeń" (str. 106) - inkubujemy komórki w pożywce zawierającej związek o stężeniu takim to i takim a nie w stężeniach. Zamiast prędkości podziałów użyłabym raczej określenia "tempo podziałów"? Praca zawiera też liczne antropomorfizacje komórek raka prostaty.

Podsumowując, pan mgr Marcin Luty prowadząc nowatorskie badania zrealizował wszystkie postawione cele. Opracował model badań lekoopornych komórek raka prostaty i przeprowadził szereg doświadczeń, które przyniosły wyniki istotne dla terapii przeciwnowotworowych. Wyniki zostały już opublikowane. Dlatego stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki stawiane przez Ustawę o Tytule i Stopniach Naukowych i towarzyszące jej rozporządzenie i stawiam wniosek o dopuszczenie mgr. Marcina Lutego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę poziom i wyniki przeprowadzonych badań oraz ich potencjalne znaczenie aplikacyjne zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

prof. dr hab. Marcin Luty