



Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz

Warszawa, 19 lutego 2020 r.

Kierownik Pracowni Molekularnych
Podstaw Ruchów Komórkowych

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Marcina Luty
pt. "Wpływ fenofibratu na lekooporność komórek raka prostaty" wykonanej pod kierunkiem
prof. dr. hab. Jarosława Czyża w Zakładzie Biologii Komórki
Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Rak prostaty to drugi po nowotworach płuca diagnozowany nowotwór u mężczyzn, który jest przyczyną przedwczesnej śmierci coraz większej części męskiej populacji. Szczególnie niebezpieczne są przerzuty tego nowotworu do innych narządów, a zwłaszcza do kości. W leczeniu raków prostaty, podobnie jak w przypadku innych nowotworów, bardzo często dochodzi do powstania lekooporności na stosowane chemioterapeutyki, połączonej z mikroewolucją komórek rakowych w kierunku bardziej inwazyjnego fenotypu. Istnieje więc pilna potrzeba opracowania skutecznej terapii skojarzonej z zastosowaniem klasycznych leków przeciwnowotworowych i innych leków (związków), które nie tylko wspomagałyby cytotoksyczne działanie chemioterapeutyków, ale zapobiegałyby także powstawaniu lekooporności. W ten nurt badań doskonale wpisują się opisane w niniejszej rozprawie badania mgr. Marcina Luty, wykonane w grupie o tak znaczącym dorobku na temat mechanizmów inwazyjności komórek nowotworowych. Doktorant zaproponował zbadanie możliwości zastosowania w terapii skojarzonej podania - obok docetakselu, klasycznego chemioterapeutyku stosowanego w leczeniu wielu nowotworów - fenofibratu, leku którego głównym wskazaniem klinicznym jest leczenie hiperlipidemii i hipercholesterolemii. Jak wynika z lektury rozprawy, jego badania, przeprowadzone w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem linii komórek wyprowadzonych z przerzutów raka prostaty, dają podwaliny do rozpoczęcia prac nad powstaniem skutecznej terapii lekoopornych przypadków raka prostaty.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich, składają się na nią 132 strony, włącznie opisem osiągnięć Doktoranta, podziękowaniami, spisem treści, wykazem skrótów oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim (w sumie to 12 stron). Wstęp liczy 28 stron i zawiera 5 rycin. Po krótkim sprecyzowaniu celów pracy następuje 15-stronnicowy rozdział materiały i metody, w którym znajduje się jedna rycina. Wyniki liczą 44 strony i zawierają 35 złożonych rycin; po nich następuje 20-stronicowa dyskusja oraz dwustronicowe podsumowanie wyników wraz z wnioskami. Rozprawa kończy się spisem piśmiennictwa, na które składa się 179 pozycji, z czego blisko 3/4 to publikacje powstałe w ostatniej dekadzie, a aż ok. 11% w minionym roku.

Ocena merytoryczna

Wysoko oceniam przedstawioną mi do oceny rozprawę, została ona przygotowana w staranny sposób, napisana zrozumiale poprawną polszczyzną, co jest trudne w czasach, gdy język angielski zdominował nauki



przyrodnicze. W zasadzie nie znalazłam literówek, co dodatkowo wskazuje na niesłychaną staranność Doktoranta i jego dbałość o stronę edytorską rozprawy. Doktorant nie ustrzegł się jednak kilku nieścisłości, o których będę sukcesywnie wspominała w tej części recenzji. Już lektura **streszczenia** spowodowała mnie do zastanowienia się nad zasadnością sformułowania: komórki typu dzikiego, które pojawiło się w odniesieniu do komórek pochodzących z nowotworów; czy to *per analogiam* do szczepów bakterii i drożdży. Co ciekawe w wersji anglojęzycznej komórki te przedstawione są jako „naive”. Ciekawa jestem opinii Doktoranta w tej kwestii.

Wykaz skrótów jest wyczerpujący, podoba mi się ich rozwinięcie również w języku angielskim; nie zauważyłam błędów w tej części rozprawy.

Wstęp to podsumowanie dotychczasowej wiedzy o epidemiologii i profilaktyce nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem procesu nowotworzenia prostaty oraz metodach leczenia nowotworów tego gruczołu. Autor opisuje także mechanizmy lekooporności nowotworów i wskazuje na możliwe sposoby zwalczania tego niepożądanego zjawiska w walce z nowotworami. Jedną z możliwości, którą Doktorant opisuje jest terapia skojarzona z wykorzystaniem fenofibratu w połączeniu ze stosowanym już w klinice lekiem przeciwnowotworowym, jakim jest pochodna taksolu, docetaksel. Fenofibrat, którego podstawowym wskazaniem klinicznym jest leczenie hiperlipidemii i hipercholesterolemii, od ponad dekady stosowany jest jako lek wspomagający klasyczną chemioterapię w zwalczaniu niektórych nowotworów, np. raka piersi, jelita grubego i nerek. Ta część jest napisana żywym językiem, Doktorant posiłkuje się pięcioma rycinami i schematami, ułatwiającymi lekturę. Zabrakło mi tu wzoru fenofibratu, zwłaszcza że Doktorant przedstawił skomplikowany wzór docetakselu. Ponadto, na stronie 26 Doktorant podaje dane epidemiologiczne o okresie przeżywalności chorych na raka prostaty w zależności od stadium choroby powołując się na publikację z 2016 r., a na stronie 28 podaje dane na podstawie pracy z 2012 r. Wydaje mi się, że powinno podawać się najbardziej aktualne informacje.

Po lekturze wstępu postawiona przez Doktoranta **hipoteza badawcza** i wynikające z niej **cele badawcze** wydają się w pełni zasadne. Doktorant postanowił zbadać działanie fenofibratu w terapii skojarzonej lekoopornych przypadków raka prostaty, co było umotywowane faktem, że udział tego leku w przypadku terapii tego nowotworu nie był dotychczas zbadany. Do badań wybrał wyprowadzone od pacjentów linie komórkowe: DU145 (wyprowadzone z przerzutu raka prostaty do mózgu) i PC3 (wyprowadzone z przerzutu raka prostaty do kości). Główny cel badawczy Autor postanowił zrealizować poprzez (i) określenie addytywności działania fenofibratu i docetakselu na badane komórki; (ii) opracowanie modelu umożliwiającego analizę wpływu leków na oporność komórek raka prostaty; (iii) określenie wpływu fenofibratu na lekooporność badanych komórek ze wskazaniem mechanizmów obserwowanego zjawiska; oraz (iv) zbadanie wpływu fenofibratu na mikroewolucję lekoopornych szczepów badanych komórek.

Dla realizacji tych ambitnych zamierzeń Doktorant zastosował wiele technik badawczych, wyczerpująco i w zasadzie prawidłowo opisanych w rozdziale **Materiały i metody**. Autor opracował metodę otrzymania lekoopornych szczepów badanych komórek i analizował ich lekooporność m.in. poprzez określenie ich aktywności proliferacyjnej w obecności badanych leków oraz inhibitorów poszczególnych transporterów z rodziny ABC, które są przede wszystkim odpowiedzialne za nabywanie oporności na podawane chemioterapeutyki. Badał również inwazyjność badanych komórek oraz ich zdolność do diapedyzy, co było możliwe dzięki zastosowaniu ko-kultury komórek raka prostaty i komórek śródbłonka ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC). Przeprowadził także analizy immunocytochemiczne oraz analizy aktywności pro-apoptotycznej i cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Analizował również poziom



transporterów ABC z wykorzystaniem spektrometrii mas. Należy podkreślić, że podał również opis zastosowanych analiz statystycznych. Zauważyłam jednak kilka nieścisłości, np. Doktorant nie podał stężeń składników przygotowanych przez siebie roztworów (na stronie 42), a stosowany przez niego barwnik do znakowania komórek nosi nazwę CellTracker, a nie Cell Tracer. Nie podoba mi się określenie medium w odniesieniu do pożywki hodowlanej.

W rozdziale **Wyniki** Doktorant przejrzysto opisuje uzyskane dane. Autor krok po kroku wyjaśnia celowość przeprowadzanych doświadczeń, każde z nich podsumowując krótkim komentarzem co znacznie ułatwia lekturę. Należy również podkreślić, że niemal wszystkie dane są poddane analizie statystycznej, wykonano również niezbędne kontrole.

W toku dobrze zaplanowanych acz żmudnych i pracochłonnych badań Doktorant wykazał, że fenofibrat może być kandydatem do potencjalnego zastosowania w terapii skojarzonej raka prostaty, zwłaszcza w przypadku nowotworów opornych na leki powszechnie stosowane w chemioterapii, takie jak docetaksel i mitoksantron. Przeprowadzone przez niego badania wykazały bowiem działanie addytywne tego związku względem wspomnianych powyżej leków na proliferację i potencjał inwazyjny badanych linii komórkowych. Doktorant wykazał również, posługując się opracowanym przez siebie modelem lekoopornych komórek, że fenofibrat uwrażliwia te lekooporne komórki raka prostaty na działanie docetakselu i mitoksantronu, co jest nową obserwacją, jako że dotychczas nie było danych o tego typu działaniu fenofibratu na komórki nowotworowe. Wyniki uzyskane przez Doktoranta wskazują, że zaobserwowana po podaniu fenofibratu blokada aktywności transporterów ABC jest skutkiem oddziaływania tego leku na energetykę badanych komórek, co prowadzi do obniżenia syntezy ATP, niezbędnego do funkcjonowania tychże transporterów. Szkoda, że Doktorant nie pokusił się o bardziej dogłębną analizę stanu mitochondriów. W kolejnym cyklu badań wykazał on również, że łączne podanie fenofibratu i docetakselu indukuje autofagię i tworzenie komórek wielojądrzastych, a więc uruchamia reakcje obronne badanych komórek rak prostaty na działanie leków. Nie zaobserwował jednak indukcji mikroewolucji szczepów, które wykazują oporność na łączne działanie obu leków, choć była ona obserwowana w przypadku komórek nie wykazujących lekooporności. Co ciekawe, uzyskane wyniki wskazują, że komórki o zwiększonej lekooporności są bardziej wrażliwe na działanie fenofibratu; jest to niewątpliwie istotna obserwacja, dodatkowo wspierająca założenie o możliwości zastosowania tego leku w leczeniu przypadków lekoopornych raków prostaty i innych nowotworów.

Uzyskane przez Doktoranta wyniki niewątpliwie mają ogromne znaczenie, dostarczyły bowiem istotnych informacji, które będą przydatne w opracowaniu nowej strategii leczenia nowotworów raka prostaty. Muszę jednak zauważyć, że sposób prezentacji graficznej tak ważkich wyników pozostawia wiele do życzenia. Przede wszystkim poszczególne składowe rycin, zwłaszcza te przedstawiające barwienia komórek są zdecydowanie za małe, a wystarczyło dodać powiększenia reprezentatywnych komórek. Ponadto, na wykresach przedstawiających trajektorie poszczególnych komórek nie widać żadnych liczb, nie znamy więc wartości bezwzględnych odległości, którą przebyły komórki, ani tempa migracji, gdyż Doktorant nie podał tych wartości w tekście, a wykresy słupkowe, powstałe w oparciu o powyższe dane, przedstawiają jedynie wartości względne, wyrażone w %. Uważam też, że zbyt dużo informacji podano w opisie do rycin, w dużej mierze pokrywają się one z tymi podanymi w rozdziale Materiały i metody.

Dyskusja jest wyczerpująca, bardzo dobrze napisana i wskazuje na dojrzałość naukową Doktoranta. Umiejętnie dyskutuje on tu swoje wyniki i przemyślenia w oparciu o najnowsze dane literaturowe (jak wspomniałam wcześniej niemal ¾ odnośników zostało opublikowanych w latach 2010-2019). Znaczna część tego rozdziału poświęcona jest zjawisku mikroewolucji nowotworów, które niesie zagrożenie niepowodzenia



stosowanych chemioterapii. Obserwacja Doktoranta, że fenofibrat podany łącznie z docetakselem nie indukuje mikroewolucji lekoopornych szczepów raka prostaty ma więc tym bardziej istotne znaczenie. Doktorant porusza także zagadnienia poznania mechanizmów działania fenofibratu na komórki lekooporne raka prostaty, ale - jak wynika z lektury tej części rozprawy - jest świadom, że jego badania to zaledwie początek. Wyraźnie to widać w ostatnim akapicie podsumowania rozprawy, gdzie wskazuje kierunki przyszłych badań. W Dyskusji brakuje mi jednak ilustracji/schematu podsumowującego uzyskane dane, mam nadzieję, że Doktorant przedstawi to podczas obrony rozprawy.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr. Marcina Luty ma bardzo dużą wartość poznawczą i niewątpliwie wzbogaca naszą wiedzę o biologii nowotworów. Daje bowiem podstawy do opracowania nowej strategii skojarzonej terapii lekoopornych przypadków raka prostaty z wykorzystaniem fenofibratu. Obszerny materiał doświadczalny, bogaty warsztat metodyczny oraz dobrze udokumentowane, oryginalne wyniki badań świadczą o doskonałym przygotowaniu Autora do samodzielnej pracy naukowej. Nie tylko właściwie zdefiniował on ważki problem badawczy (i kliniczny), ale również w sposób umijętny i systematyczny go rozwiązał, uzyskując interesujące i nowatorskie wyniki, które mogą być w przyszłości zastosowane w zwalczaniu raka prostaty. Doktorant potrafi również korzystać z rozległego piśmiennictwa w swojej dziedzinie badań i w oparciu o nie dyskutować swoje wyniki oraz wskazywać kierunki przyszłych badań. Część wyników Doktoranta została przedstawiona w artykule opublikowanym w renomowanym czasopiśmie *Cancers*, którego IF za 2018 r. wynosi 6.162; jest on w tym artykule pierwszym autorem. Wyniki przedstawione w rozprawie były prezentowane na trzech międzynarodowych kongresach - dwukrotnie na kongresie FEBS i na kongresie European Association for Cancer Research. Doktorant jest również współautorem czterech innych publikacji, które nie są bezpośrednio związane z tematem rozprawy doktorskiej.

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

Rozprawa doktorska mgr. Marcina Luty 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. nr 65, poz. 595 ze zm.). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie mgr. Marcina Luty do dalszych etapów przewodu doktorskiego w sprawie nadania mu stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia.

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

Maria Jolanta Rędownicz