



nencki institute
of experimental biology

**POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY**

Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland

Phone: (48-22) 659 85 71; Fax: (48-22) 822 53 42

E-mail: sekretariat@nencki.gov.pl; <http://www.nencki.gov.pl>

Prof. dr hab. Ewa Sikora

Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia

Recenzja pracy doktorskiej pani mgr Patrycji Tudrej pt. „Charakterystyka molekularna i funkcjonalna modelowych linii komórkowych raka jajnika *in vitro*” wykonanej pod kierunkiem pani prof. dr hab. n.med Katarzyny Lisowskiej

Praca pani Tudrej wykonana była w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie- Państwowego Instytutu Badawczego, Oddział w Gliwicach.

Dysertacja przedstawiona jest w formie tak zwanej „spinki”, w skład której wchodzi jedna praca doświadczalna i dwie prace przeglądowe. Wszystkie prace są wieloautorskie. Doktorantka załączyła do tego zestawu tytuły dwóch streszczeń z międzynarodowych konferencji, które zostały opublikowane w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu. Jak się domyślam wyniki prezentowane na tych konferencjach (w formie plakatu) znalazły się również w opublikowanej pracy doświadczalnej i niczego nowego nie wnoszą.

Prace przeglądowe, poza tym, że są cenne same w sobie, nie zawierają żadnej analizy, którą można by uznać za oryginalne, teoretyczne opracowanie poruszanego w dysertacji zagadnienia, nie będą więc przedmiotem mojej oceny, zwłaszcza, że doktorat jest z zakresu nauk eksperymentalnych. Tak więc *de facto*, dysertacja pani Tudrej to jedna praca doświadczalna opublikowana w *International Journal of Molecular Science* w 2018 roku. Współczynnik przebicia czasopisma to 4,183.

Artykuł został opublikowany w specjalnym numerze: Ovarian Cancer: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment.

Nowotwory ze swej natury są heterogenne, jednakże rak jajnika stanowi przykład wyjątkowej heterogenności spowodowanej różnym pochodzeniem histologicznym. Jak się dowiedziałam z dysertacji pani Tudrej istniejąca klasyfikacja raka jajnika jest szczególnie trudna i niejednoznaczna. Wydaje się jednak, że niskozróżnicowany rak surowiczy (HGSOC) o największej złośliwości i złych rokowaniach jest szczególnie kontrowersyjny. Wiele ustalonych linii komórkowych raka jajnika mylnie jest zaliczanych do HGSOC, tak więc istnieje potrzeba uzyskania wiarygodnego modelu HGSOC do badań *in vitro*. Dlatego też Doktorantka podjęła się wyprowadzenia linii komórkowej, która byłaby wiarygodnym modelem tego typu raka. Ponadto, scharakteryzowała ona pięć komercyjnie dostępnych linii komórek raka jajnika najczęściej wykorzystanych w badaniach podstawowych. Wyniki zostały opublikowane we wspominanej pracy oryginalnej.

Uważam, że cel pracy doktorskiej, jasno i jednoznacznie sformułowany, jest jak najbardziej zasadny. Szkoda tylko, że Doktorantka nigdzie nie cytuje wcześniejszej pracy Kreuzinger i wsp. opublikowanej w *Cancer Letters* w 2015 roku. W badaniach tych wyprowadzono i scharakteryzowano aż siedem linii typu HGSOC, na co wskazuje już sam tytuł tej pracy: „Molecular characterization of 7 new established cell lines from high grade serous ovarian cancer”. Dokonano w niej charakterystyki genomowej, transkryptomicznej, histologicznej i funkcjonalnej. Jest się do czego odnieść w dyskusji.

Wracając jednak do pracy będącej podstawą tej dysertacji, to uczestniczyło w niej w sumie 13 osób umieszczonych na liście współautorów. Nie licząc Doktorantki i Jej promotorki, to mamy 11 umysłów i par rąk partycypujących w tych badaniach. Tylko czworo ze współautorów złożyło stosowane oświadczenia o swoim w nich udziale. Co z pozostałymi? W umieszczonej w publikacji informacji Author Contribution mamy pełen zestaw współautorów, którzy przyczynili się do powstania tej pracy i to zarówno w części metodycznej, jak i przygotowaniu manuskryptu do publikacji. Jestem ciekawa, czemu na przykład pani dr Olbryt, która jest umieszczona w

aktywnościach, takich jak: conceptualization, investigation, methodology, visualization, writing—original draft, writing—review and editing, nie złożyła swojego oświadczenia w dysertacji pani Tudrej?

Odnosząc się do strony merytorycznej tej publikacji, trzeba powiedzieć, że rola superrecenzenta jest zawsze trudna, bo siłą rzeczy ocenia on nie tylko autorów, ale też recenzentów, którzy zaakceptowali do publikacji pracę.

Jest to praca poprawna zarówno koncepcyjnie jak i metodologicznie. Wykonano w niej wiele analiz dających, może nie pełną ale, wystarczającą charakterystykę genomową, histologiczną i wybranych funkcji komórek, które pozwalają określić badane linie komercyjne jak i wyprowadzoną linię OVPA8 po względem ich pochodzenia. Zarówno profil immunofenotypowy jak i mutacyjny pozwalają na zaklasyfikowanie dostępnej linii OVCAR3 oraz wyprowadzonej linii komórkowej OVPA8 to typu nieodróżnicowanego raka surowiczego HGSOC. W przypadku pozostałych komercyjnie dostępnych linii badania weryfikują nie zawsze trafną dotychczasową ich klasyfikację. Tak więc, dużym osiągnięciem tej pracy jest to, że linia komórkowa OVPA8 wyprowadzona z komórek wyizolowanych z płynu wysiękowego pacjentki ze zdiagnozowanym rakiem surowiczym została szczegółowo scharakteryzowana i może służyć jako model do badań *in vitro* HGSOC, raka jajnika będącego najczęściej występującym i najgorzej rokującym typem tego nowotworu. Została ona udostępniona innym badaczom, gdyż złożono ją do dwóch komórkowych repozytoriów: ECACC i DSMZ.

W pracy Tudrej i wsp. do otrzymania wyników wykorzystano bardzo wiele metod do analizy genetycznej, immunocytochemicznej, komórkowej, takich jak Short Tandem Repeat (STR) Analysis, NGS, analiza kariotypu, FACS, barwienie immunocytochemiczne, test migracji, RT-PCR, WB, test na chemowrażliwość i inne. Jest to duża praca, zwłaszcza jeśli się weźmie pod uwagę, że analizie poddano w sumie 6 linii komórkowych i każdą z nich dodatkowo przebadano na obecność mykoplazmy oraz wirusów: HIV, HCV i HBV.

Mam kilka pytań i uwag do Doktorantki:

1. Komórki wyprowadzonej linii są aneuploidalno/poliploidalne. Mają liczne aberracje strukturalne i liczbę chromosomów od 57 do 67. Pacjentka, od której pobrano wysięk była po wielu cyklach chemioterapii. Zwykle uważa się, że następuje selekcja komórek opornych na leczenie. Czy jednak terapia mogła doprowadzić do powstania oporności poprzez indukcję poliploidii w niektórych komórkach? Czy wiadomo Pani na czym polega oporność związana z poliploidią? To ogólne pytanie ma też odniesienie do danych zamieszczonych w suplemencie do pracy. Mianowicie, przeżywalność komórek po działaniu związków cytotoksycznych *in vitro* mierzy się zwykle testem określającym metabolizm mitochondriów. Spadek metabolizmu ma określać spadek zdolności proliferacyjnej i żywotności. Tymczasem, chemioterapeutyki powodują wzrost ploidii często (może zawsze) związany z przejściowym starzeniem komórek (cellular senescence), a nie ich śmiercią. Co gorzej ten stan poliploidii/starzenia może być początkiem nowych podziałów komórkowych. Jest to pytanie wykraczające poza zakres dysertacji, ale zadając je chciałam zwrócić uwagę na problem, który jest zwykle pomijany przez badaczy określających testami metabolicznymi stan żywotności komórek. Warto więc, aby młody naukowiec wiedział, że taki problem istnieje. Testy były wykonywane w zależności od stężenia podanego związku i pomiaru dokonywano testem Alamar Blue po trzech dniach. Po tym czasie traktowania z pewnością w niektórych stężeniach stosowane przez Doktorantkę związki mogą indukować starzenie/poliploidię. Z tego powodu testy pomiaru metabolizmu są coraz częściej kwestionowane jako wskaźnik żywotności komórek nowotworowych. Stare komórki mają obniżony metabolizm, nie proliferują, ale żyją. Warto o tym wiedzieć na przyszłość. *Nota bene*, czemu suplementy nie znalazły się w rozprawie doktorskiej?
2. W pracy znajdziemy takie zdanie: „When the confluence reaches 100%, the cells start to grow closer, but still in a monolayer, and without evidence of massive cell death, which means that they are resistant to anoikis”. Czy rzeczywiście na podstawie tej obserwacji możemy wyciągnąć wniosek, że

komórki OVPA8 są odporne na anoikis? Jak to koresponduje z bardzo słabą zdolnością do migracji tych komórek? Chciałabym się dowiedzieć, co właściwie Doktorantka rozumie przez anoikis?

3. Figura 4 przedstawia zdjęcia spod mikroskopu komórek wszystkich linii komórkowych. Trzy zdjęcia komórek OPVA8 podpisane są następująco: „ascitic fluid”, „low confluency” i „high confluency”. Rozumiem, że „ascitic fluid” oznacza komórki w fazie zaraz po izolacji z płynu wysiękowego pacjentki? A pozostałe? Czy to już późniejsze pasażę? Czy aby wszystkie zdjęcia były wykonane pod tym samym powiększeniem?
4. Figura 13B przedstawia wyniki z WB wybranych białek. Prawidłowa analiza WB powinna być wykonana na jednym żelu, aby intensywność prążków była porównywalna. Wiele czasopism nie przyjmuje do druku „pociętych” blotów. Prążki białka referencyjnego HSC70 mają różną intensywność dla różnych komórek. Dlaczego akurat to białko zostało wybrane jako referencyjne? Jak wytłumaczyć fakt, że mRNA podjednostki fibronektyny FN1 jest na podobnym poziomie w komórkach OVPA8 i OVCAR3, a w komórkach OVACAR3 w ogóle nie ma białka?
5. Oprócz wspomnianych oświadczeń kilku współautorów i suplementów brakuje w tej dysertacji trzeciej strony publikacji oraz abstraktu graficznego z *IJMS*, który znajduje się na stronie internetowej zespołu pani profesor Lisowskiej.

Podsumowując tę krótką recenzję, muszę powiedzieć, że nie widzę uzasadnienia przedstawiania dysertacji pani Tudrej w formie zbioru publikacji, jeśli moim zdaniem, jest to tylko jedna publikacja. Ciekawa jestem jak wyglądałaby dysertacja przedstawiona w formie klasycznej? Wiadomo, że dzisiejsza praca naukowa polega na współpracy i że wynikiem tej współpracy są wieloautorskie prace. Jednak pomimo załączonych oświadczeń, łącznie z oświadczeniem Doktorantki, bardzo trudno jest ocenić Jej wkład w tę pracę. Jakie doświadczenia wykonała sama, którą dokumentację przygotowała samodzielnie? Niektóre czasopisma życzą sobie precyzyjnych

oświadczeń, typu: kto ze współautorów przygotował poszczególne rysunki, co oznacza nie tylko graficzne przedstawienie danych, ale wiodącą rolę w ich uzyskaniu. Chętnie się tego dowiem podczas obrony. Jak wyczytałam na stronie internetowej Instytutu, pani Tudrej „Od 2014 roku realizuje projekt doktorski w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Lisowskiej”. W ciągu sześciu lat można by spodziewać się znacznie więcej wyników, z których nie wszystkie muszą być już opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Publikacja stanowiąca podstawę tej dysertacji została opublikowana w lipcu 2018 roku, ale doświadczenia do niej musiały być zakończone wcześniej, nawet jeśli praca została przyjęta do *International Journal of Molecular Sciences* jako pierwszego czasopisma, do którego ją wysłano. Aż się prosi, żeby dalej śledzić i analizować wyprowadzoną linię. Czy takie doświadczenia po opublikowaniu pracy zostały wykonane? Jednym słowem, interesuje mnie motywacja Doktorantki do przedstawienia dysertacji w takiej właśnie formie i czy prace przeglądowe dołączone do niej to ustalony zwyczaj w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów? Osobiście, jeśli widzę tego typu „spinkę”, to mam wiele wątpliwości co do wiodącego udziału Doktorantki w tak przedstawionej dysertacji. A już na pewno nie widzę pełnego Jej zaangażowania w przygotowanie dobrej pracy. Dysertacja sprawia wrażenie jakby nie koniecznie ciekawość naukowa Doktorantki była jej głównym motorem.

Moje krytyczne uwagi dotyczą głównie, choć nie tylko, natury formalnej, chociaż taką ocenę dysertacja musiała przejść przed wysłaniem do recenzji. Uważam, że praca opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences* jest na wysokim poziomie i wyprowadzenie stabilnej linii OVPA8 stanowiącej model niskozróżnicowanego raka surowiczego jajnika jest dużym osiągnięciem. Chętnie dowiem się, czy komórki te obecnie utrzymują swój genotyp i fenotyp.

Pomimo przedstawionych zastrzeżeń, uznałam (choć nie bez wahania), że rozprawa odpowiada warunkom określonym w art.13.ust.1 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule

naukowym w zakresie sztuki (Załącznik do obwieszczenia Marszałka Sejmu RP z dnia 2 grudnia 2014 r.-Dz.U. poz. 1852). Wnoszę zatem, chociaż bez entuzjazmu, do Rady Naukowej Centrum Onkologii- Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie o wszczęcie dalszych etapów przewodu doktorskiego pani mgr Patrycji Tudrej.

Warszawa, 11.01.2021

