

Samodzielna Pracownia Diagnostyki i Immunologii Nowotworów

**I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie**

Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Iwona Wertel

20-081 Lublin, ul. Staszica 16, tel. 81 53278 47, fax 81 5320608

Lublin 18.02.2021 r.

OCENA

**rozprawy doktorskiej mgr Aleksandra Corteza
pt. „Wpływ białka ITGBL1 na fenotyp komórek raka jajnika”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska **mgr Aleksandra Corteza** została wykonana pod kierunkiem **prof. dr hab. n. med. Katarzyny Lisowskiej** w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach.

W ciągu ostatnich lat nastąpił gwałtowny rozwój technik biologii molekularnej. Możliwość sekwencjonowania ludzkiego genomu czy genomu nowotworów tzw. (*The Cancer Genom Atlas Project*) doprowadziła do wykrycia różnic w genotypie i fenotypie poszczególnych nowotworów, a nawet pomiędzy poszczególnymi typami histologicznymi tego samego nowotworu, czego doskonałym przykładem jest rak jajnika (*ovarian cancer*, OC). Badania ostatnich lat dowiodły, że guzy diagnozowane jako rak jajnika stanowią heterogenną grupę nowotworów, które mają odrębną histogenezę, odmienny tor mutacyjny oraz zróżnicowany przebieg kliniczny. Odkrycia te są niezwykle cenne w kontekście postępowania klinicznego i powinny być uwzględnione w projektowaniu badań nad biologią OC oraz przy poszukiwaniu nowych celów terapeutycznych. W opisane trendy badawcze wpisuje się tematyka dysertacji mgr Aleksandra Corteza.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „*Wpływ białka ITGBL1 na fenotyp komórek raka jajnika*” posiada układ typowy dla dysertacji doktorskich przedstawianych w formie zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. W zbiorze tym jeden artykuł stanowi praca poglądowa (*Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2018, 81:17-3, **IF 3.008**), drugi obszerna praca oryginalna opublikowana w *Cancers*, 2020, 12:2627, **IF 6.126**. Uzupełnienie wyników badań zawartych w pracy oryginalnej stanowią trzy doniesienia konferencyjne opublikowane w recenzowanych materiałach z konferencji międzynarodowych, które zaprezentowano w latach 2017-2019.

W pracy oryginalnej mgr Aleksander Cortez jest pierwszym autorem i miał wiodący udział w jej powstaniu. Wkład doktoranta obejmował koncepcję i założenia badań, ich wykonanie oraz przygotowanie manuskryptu do druku. Wszyscy współautorzy jednomyślnie uznali wiodącą rolę badawczą doktoranta w przeprowadzonych eksperymentach oraz przygotowaniu publikacji. W pracy poglądowej mgr Aleksander Cortez jest również pierwszym autorem, jednakże uwagę recenzenta zwrócił fakt, że praca ta (*Cancer Chemotherapy and Pharmacology* w 2018; 81:17-3, **IF 3.008**) była już wcześniej włączona do rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Tudrej, na co doktorant wyraził zgodę w złożonym oświadczeniu. W związku z powyższym, w opinii recenzenta, udział doktoranta w powstaniu tej pracy nie jest wiodący.

Rozprawa doktorska pt. „*Wpływ białka ITGBL1 na fenotyp komórek raka jajnika*” liczy 118 stron. Zawiera wykaz dwóch prac z listy MNiSW składających się na rozprawę oraz trzech doniesień konferencyjnych opublikowanych w recenzowanych materiałach z konferencji międzynarodowych, streszczenie w języku polskim, opisujące założenia i cel pracy, omówienie metod badawczych i najważniejszych wyników badań. Kolejne podrozdziały to podsumowanie oraz piśmiennictwo. W dysertacji autor umieścił pełne teksty publikacji stanowiących rozprawę i doniesienia konferencyjne, stanowiące jej uzupełnienie. Na końcu rozprawy doktorskiej znajdują się oświadczenia współautorów, którzy wyrazili zgodę na włączenie wyszczególnionych prac do przedłożonej do oceny dysertacji.

Mgr Aleksander Cortez za cel pracy postawił sobie zbadanie wpływu białka ITGBL1 na fenotyp wybranych linii komórkowych raka jajnika. Szczegółowe cele badań eksperymentalnych obejmowały ocenę wpływu ITGBL1 na tempo wzrostu, migracji, inwazji oraz adhezji komórek w warunkach hodowli *in vitro*. Ponadto badał wpływ ITGBL1 na przeżywalność komórek traktowanych chemioterapeutykami, takimi jak cisplatyna i paklitaksel, które wykorzystywane są w standardowym leczeniu raka jajnika.

Należy podkreślić, że przeprowadzone badania stanowią kontynuację wcześniejszych prac eksperymentalnych zespołu Pani Prof. Katarzyny Lisowskiej, w których za pomocą mikromacierzy DNA zanalizowano profile ekspresji genów w ponad 100 próbkach raka jajnika. Badania te wykazały obecność dwóch podtypów molekularnych niskozróżnicowanego surowiczego OC jajnika różniących się profilem ekspresji genów. Co istotne, wykazane różnice miały przełożenie kliniczne na czas przeżycia pacjentek. Wśród 96 genów, których ekspresja korelowała z krótszym przeżyciem pacjentek z OC był gen *ITGBL1*, kodujący słabo dotychczas poznane białko ITGBL1. Odkrycie to stało się inspiracją do kolejnych eksperymentów, których wyniki doktorant przedstawił w obszernej publikacji oryginalnej pt. „*Evaluation of the role of ITGBL1 in Ovarian Cancer*”. *Cancers*, 2020, 12(9):2627, IF 6.126.

Dla realizacji celu doktorant wykonał pracochłonne eksperymenty oraz dokonał wnikliwej, przemyślanej analizy wyników badań. Model badawczy stanowiły cztery komercyjnie dostępne linie komórkowe raka jajnika (OVCAR3, SKOV3, OAW42, ES2) oraz linia komórkowa OVPA8, stanowiąca model surowiczego OC o niskim stopniu zróżnicowania histologicznego (HGSOC).

W pierwszym etapie eksperymentu mgr Cortez oceniał obecność poszczególnych wariantów mRNA *ITGBL1* w wymienionych modelach linii komórkowych OC. Następnie skonstruował model komórkowy składający się z linii kontrolnej i linii z nadekspresją *ITGBL1*, wykorzystując retowirusowy system transferu genów. Celem weryfikacji otrzymanego modelu, porównał poziom ekspresji *ITGBL1* metodą RT-PCR i western blott w dzikich i genetycznie zmodyfikowanych liniach komórkowych. W dalszym etapie eksperymentu oceniał wpływ nadekspresji *ITGBL1* na procesy adhezji komórek, ich ruchliwość i inwazyjność, tempo proliferacji, oraz wrażliwość na chemioterapię. Ponadto analizował wpływ *ITGBL1* na komórkowe ścieżki sygnałowe w raku jajnika.

Kandydat niewątpliwie wykazał dobre przygotowanie teoretyczne oraz doskonałe opanowanie warsztatu badawczego. Szczególnie wysoko oceniam ciągłość badań oraz wykorzystanie przez doktoranta różnorodnych, nowoczesnych technik laboratoryjnych takich jak: łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), mikromacierze DNA i analiza za pomocą metody nienadzorowanej, cytometria przepływowa, western blotting, testy do oceny adhezji komórek, testy do oceny migracji w systemie transwell i inwazji w matryzeli. Dzięki tym metodom doktorant scharakteryzował profil funkcjonalny linii z nadekspresją *ITGBL1*.

Doktorant wykazał, że nadekspresja *ITGBL1* w komórkach OC może mieć związek z gorszym przebiegiem klinicznym choroby. Cechy takie jak zmieniona adhezyjność, zwiększona zdolność do migracji oraz inwazyjność mogą mieć istotne znaczenie w mechanizmach tworzenia przerzutów wewnątrztrzewnowych. Zaobserwowana przez doktoranta oporność na cisplatynę i paklitaksel może być przyczyną szybszej progresji choroby.

Ponadto doktorant wykazał, że nadekspresja ITGBL1 ma wpływ na szlaki sygnalizacyjne związane ze strukturą i funkcją macierzy zewnątrzkomórkowej, komunikacją międzykomórkową, a także migracją i sygnalizacją za pośrednictwem integrzyn.

Wszystkie te procesy mogą istotnie wpływać na progresję choroby i gorsze rokowanie u pacjentek z OC.

Wykonanie ambitnych, pracochłonnych i czasochłonnych etapów eksperymentu, nie budzi żadnych zastrzeżeń. Autor szczegółowo opisuje wykonanie poszczególnych etapów oznaczeń, co dowodzi rzetelności wykonanych badań, a także umożliwia ich powtórzenie. Doktorant wywiązał się z podjętego zadania oceny wpływu białka ITGBL1 na fenotyp komórek raka jajnika.

Na stronie 43, w publikacji oryginalnej, w sekcji Results, rozdział 2.1 widnieje nagłówek „ITGBL1 mRNA expression in **ovarian cancer tissue** and cell lines”, jednakże w pracy nie znalazłam informacji na temat oceny mRNA ITGBL1 w tkance raka jajnika. Chciałabym zapytać czy doktorant oceniał ekspresję ITGBL1 mRNA w tkance i co wykazały wyniki tych badań?

Praca pogładowa pt. „*Advances in ovarian cancer therapy*” wg bazy Web of Science, Core Collection, była do dnia 18.02.2021 roku **cytowana 145 razy**. Mgr Aleksander Cortez opisał w niej standardowe terapie w OC oraz najnowsze terapie stosowane w klinice i/lub badaniach klinicznych, w tym antyangiogenne, inhibitory polimerazy poli-ADP rybozy, a także inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych, których wykrycie zrewolucjonizowało immunoterapię kliniczną w przypadku niektórych nowotworów.

Proszę doktoranta o wyjaśnienie:

-dlaczego zastosowanie inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych w raku jajnika nie dało jak dotąd tak spektakularnych efektów leczenia jak np. w czerniaku?

-czy jest nadzieja na poprawę efektów leczenia OC i wydłużenie czasu przeżycia pacjentek chorych na ten nowotwór?

Bardzo proszę o komentarz odnośnie tych kwestii.

Przedłożony do oceny manuskrypt napisany jest w sposób przejrzysty i logiczny. Uwagę zwraca szczególnie dopracowana szata graficzna i sposób prezentacji wyników badań doktoranta w publikacji oryginalnej. Opracowanie poszczególnych rozdziałów ma czytelną konstrukcję. Praca jest napisana poprawnym językiem.

WNIOSKI KOŃCOWE

Podsumowując pragnę podkreślić, że przedstawiona do recenzji praca mgr Aleksandra Corteza pt. „*Wpływ białka ITGBL1 na fenotyp komórek raka jajnika*” jest opracowaniem interesującego problemu naukowego. Doktorant wykazał duże umiejętności prowadzenia eksperymentalnych badań naukowych, zdolność wnikliwej analizy i interpretacji wyników oraz wyciągania płynących z badań wniosków. Recenzowana dysertacja posiada oryginalny aspekt poznawczy. Praca pt. „*Wpływ białka ITGBL1 na fenotyp komórek raka jajnika*” spełnia wymogi merytoryczne i formalne stawiane rozprawom doktorskim (*Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r., Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, art. 187 ust. 3*).

Wobec powyższego wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie Państwowego Instytutu Badawczego z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i o dopuszczenie mgr Aleksandra Corteza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Iwona Wertel
UNIwersytet Medyczny w Lublinie
Al. Racławickie 1, 20-059 Lublin
tel. 885-151-151

