

Poznań, 31 lipiec 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Mariusza Kulińczaka
„Ocena *in vitro* wpływu wybranych związków na komórki
o cechach nowotworowych komórek macierzystych w raku jajnika”

Narodowy Instytut Onkologii im Marii Skłodowskiej-Curie zlecił mi dokonanie recenzji załączonej dysertacji doktorskiej. Dziękuję za powierzenie mi tego zadania z pełną świadomością, że z jednej strony to honor a z drugiej obowiązek. Przyjmuję jedno i drugie.

Zgodnie z bieżącymi zaleceniami ocenie podlega wyłącznie rozprawa doktorska. Niemniej zajrzałem do powszechnie dostępnej bazy danych PubMed, by dowiedzieć się, że kandydat ma już spore doświadczenie badawcze udokumentowane opublikowaniem 9 prac w czasopismach posiadających współczynnik IF. Wszystkie publikacje powstały w obszarze biologii nowotworów a część z nich można przypisać do tematyki związanej z badaniami przeprowadzonymi w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Rozprawę stanowi odrębne opracowanie liczące 300 stron i skonstruowane zasadniczo w sposób typowy dla rozpraw doktorskich.

Zamiar przeprowadzenia badań nad skutecznością leczenia nowotworów jajnika przedstawiono w nawiązaniu do charakterystyki tej jednostki chorobowej. Pierwszym wskazaniem celowości badań jest wysoka zapadalność kobiet na raka jajnika. Nie mogę kwestionować informacji przedstawionych w rozprawie na mapie świata (Ryc. 2) a zawierającej dane pochodzące z tak niekwestionowanych instytucji jak WHO czy IARC. Jednak trudno z tej mapy wydedukować jakiegokolwiek związki przyczynowe na temat raka jajnika. Niska zapadalność w krajach afrykańskich nie będących liderami warunków życia, wyżywienia i higieny znajduje przeciwstawienie w wysokiej zapadalności w Rosji, czy Syberii. Tłumaczenia szukałbym raczej w zróżnicowanej wiarygodności danych krajowych. Zdziwienie pozostaje, ale należy przyjąć dane z Ryc. 2 bezdyskusyjnie. Dalej kandydat przywołuje informacje na temat nikłej skuteczności leczenia z akcentem na względnie niską wyleczalność

raka jajnika pochodnymi cisplatyny i taksanami. Występujące nawroty choroby a dodatkowo pojawia się nabieranie oporności na leki stosowane w obrębie chemioterapii. Temat występowania i zwalczania chemio-oporności nie jest nowy ale często występujące niepowodzenia w próbach ominięcia chemio-oporności zostawiają miejsce do rozległych badań i tutaj pojawia się recenzowana dysertacja.

Kolejnym zagadnieniem omawianym, we wprowadzeniu jest dosyć krótka charakterystyka nowotworowych komórek macierzystych. Odnotowując pewną heterogenność tej frakcji komórkowej w większym stopniu nawiązałbym do heterogenności jako cesze towarzyszącej nowotworzeniu przez cały czas. Ma to miejsce od samego początku transformacji nowotworowej, gdzie czynniki pronowotworowe, czy to fizyczne, czy chemiczne, docierają do narażonego organu (tkanki) z różną intensywnością, na zmienną głębokość, komórki zawierające uszkodzenia materiału genetycznego znajdują się w różnym mikrośrodkowisku i dalsza ich progresja prowadzi współbieżnie do zaistnienia heterogennej masy guza, co znajduje odbicie na poziomie czy to chromosomowym czy molekularnym. Tekst pracy w tym miejscu zdaje się wiązać heterogenność tylko z określonym etapem nowotworzenia a mianowicie z pojawianiem się nowotworowych komórek macierzystych.

Później uwaga nakierowana jest głównie na rozpoznawanie markerów powierzchniowych wykorzystywanych z różną skutecznością do celów prognostycznych, co znajdzie swoje odbicie w relacjonowanych badaniach własnych. Ten fragment wprowadzenia został wystarczająco i kompetentnie przedstawiony.

W ostatniej części wprowadzenia kandydat skupia się na zastosowaniu pochodnych guanidyny w leczeniu cukrzycy i nowotworów. Powiązanie pochodnych guanidyny a leczeniem cukrzycy jest dobrze znane. Kandydatowi trafiło się tutaj niefortunne sformułowanie (str. 39) o spadku zainteresowania pochodnymi guanidyny wobec leczenia cukrzycy dozowaniem insuliny. Dotyczy to jednak tylko cukrzycy typu I a chorzy na cukrzycę typu II w dalszych ciągu regulują poziom cukru metforminą, chociaż - co trzeba odnotować - niektórzy praktycy są przeciwni takiemu postępowaniu.

Krańcowa zwartość podania celu pracy (str. 43 – jedno /!/ zdanie) nie wychodzi dysertacji na dobre. Kandydat nie określa, czy zamierza porównać skuteczność pochodnych cis-platyny i guanidyny jako leków pierwszego wyboru, czy też interesuje go postępowanie kombinacyjne lub następowe w jakimkolwiek układzie. Nie ma wskazania, czy po wykryciu spodziewanych różnic działania przeciwnowotworowego zostanie podjęta próba przybliżenia

mechanizmu. Można oczekiwać, że badanie porównawcze ekspresji genów pojawia się na zasadzie *deus ex machina* i niezbyt wiadomo jakiemu służy celowi. Lakoniczność określenia celu nie pozwala na rozumieniu szlaku decyzyjnego podjętych badań.

Część doświadczalną otwiera charakterystyka czterech stosowanych linii komórkowych wyprowadzonych z nowotworów jajnika. Podstawowym czynnikiem różnicującym linie była obecność różnych mutacji genu przeciwnowotworowego *TP53*. Odnotowuję jednak, że badawczo nie wykorzystano obecności lub jej braku mutacji genu *TP53* w genomach badanych linii komórkowych. Poproszę o komentarz na ten temat w trakcie obrony. Recenzując publikacje i prace promocyjne często trafiam na wyliczanie badanych linii komórkowych z pominięciem ich charakterystyki; potem pojawiają się zróżnicowane wyniki, których bez danych o liniach komórkowych wytłumaczyć nie można. Doktorant nie wpadł w tę pułapkę i chwałę go za niezbędną szczegółowość charakterystyki wszystkich stosowanych linii. Dla porządku dodaję, że linia IGROV 1 posłużyła dalej do wyprowadzenia kolejnych wariantów komórkowych służących do oceny działania metforminy i fenforminy. W tym miejscu należy też dodać, że doświadczenia prowadzone na liniach komórkowych nie wymagają akceptacji komisji bioetycznej.

Metody z zakresu biologii komórki (ocena migracji komórek, cytometria przepływowa, klonogenność, Western Blot do oceny ekspresji białek) i molekularnej (RT-qPCR, NGS, profilowanie ekspresji genów itp.) przedstawiono starannie (str. 44-56) i nie dopatrzyłem się błędów. Zastosowanie opisanych technik badawczych służyło do przeprowadzenia analizy ekspresji genów powiązanych z potencjalnym przeciwnowotworowym działaniem badanych związków. Zgodnie z założeniami pracy wykazano zróżnicowanie profili ekspresji genów w badanych liniach komórkowych. Ponieważ fenformina powodowała udokumentowane w dysertacji skuteczniejsze zmiany macierzystości i agresywności komórek nowotworowych a jednocześnie indukowała większą wrażliwość na cisplatynę badanie fenotypu powierzchniowego nakierowano na geny regulujące to działanie. Uwagę skoncentrowano na genach, których ekspresja ulega zmianie w warunkach nabywania oporności na fenforminę. Wykazano silne zmiany ekspresji (pierwotnie spadek, potem wzrost) 629 genów i odwrotną zależność (wzrost / spadek) u 674 genów. Analiza bioinformatyczna oraz porównania pomiędzy badanymi liniami komórek pozwoliła na silną redukcję liczby genów. Zawężenie liczby genów poprzez przypisanie ich do określonych procesów metabolicznych a zwłaszcza udziału w kształtowaniu macierzystości i

agresywności komórek nowotworowych redukuje liczbę interesujących genów do kilkunastu. Ponadto przy pomocy narzędzi bioinformatycznych wykazano powiązanie części genów z procesami podziałów komórkowych, starzenia komórkowego i epigenetycznej regulacji ekspresji genów a wszystkie to procesy grają istotną rolę w nowotworzeniu.

Nie mam żadnych zastrzeżeń do przeprowadzonych doświadczeń nad ekspresją genów. Kandydat poruszał się ogólnie przyjętą drogą zmierzającą do identyfikacji poszukiwanych genów, co obejmuje najpierw ustalenie profilu ekspresji genów, wyłonienie genów o krańcowo wysokiej i niskiej ekspresji z założeniem, że tam właśnie kryją się geny, przyspieszające lub hamujące badany proces. Chciałbym, żeby doktorant podczas obrony przedyskutował to założenie, wskazując na możliwość minięcia się z oczekiwaniami i dodatkowych działań naprowadzających na cel. Zawsze bowiem można trafić na ewentualność, że nadmierna lub zredukowana ekspresja genów wiąże się z udziałem genów w zupełnie odrębnym procesie metabolicznym.

Wnioski podane w dysertacji (w liczbie ośmiu) bezpośrednio wynikają z przeprowadzonych badań i są prawidłowe. Najważniejszym z mojego punktu widzenia jest wskazanie na potencjał przeciwnowotworowy fenforminy, co ma miejsce w znacznie słabszym stopniu wobec metforminy. Działanie fenforminy, ma jednak tendencję do odwracalności. Zjawisko to wytłumaczono zmianami ekspresji szeregu genów związanych ze zjawiskiem nabierania chemio-oporności.

Ostatecznie w wyniku przeprowadzonych eksperymentów pozostajemy przy względnie dużej liczbie genów związanych z badanym udziałem fenforminy w hamowaniu procesu nowotworowego. Co prawda kandydat starannie omija kwestie kliniczne, ale cały podjęty temat badań zmierza ku terapeutycznemu wykorzystaniu ustaleń opisanych w dysertacji. Właśnie liczba wskazanych genów daje pewne rozmycie jednoznaczności i utrudnia dalsze postępowanie w stronę kliniczną. Brakuje mi chociaż sugestii, gdzie kandydat upatruje geny do wykorzystania w terapii celowanej. Mam oczywiście rozeznanie w rozmiarach przeprowadzonych badań i wiem, że nie można ich przekroczyć z racji ograniczeń czasowych i finansowych badań w ramach doktoratu. W każdym razie dyskusja wyników pozwala na rozwinięcie tematyki w stronę użyteczności klinicznej a tego nie podjęto.

Recenzowane badania stanowią istotne *novum* w biologii nowotworów i tym samym przyczyniają się do postępu w tej dziedzinie. Niestety zadaną rolę recenzenta jest

„czepiać” i stąd uwagi i zastrzeżenia, które pojawiły się w recenzji. Nie naruszają one jednak struktury i tym bardziej wniosków wyprowadzonych z badań i zawartych w dysertacji. Nie tracę jednocześnie nadziei na podjęcie dyskusji akademickiej na wskazane tematy.

Podsumowując, uważam, że praca w pełni spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim (Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19.01.2018 w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora, Dz. Ustaw, 2018, POZ. 261) i wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii w Warszawie o przeprowadzenie dalszych etapów proceduralnych w przewodzie doktorskim.


Prof. med. dr hab. Krzysztof Szyfter