



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY

ZAKŁAD BIOCHEMII I ŻYWIENIA



Warszawa, 24 lipca 2023 r.

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

Praca doktorska mgr. Mariusza Kulińczaka została wykonana w Zakładzie Biologii Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie pod kierunkiem dr. hab. n. med. Jana Konrada Siwickiego, profesora Instytutu.

Rak jajnika jest piątym, co do częstości występowania na świecie nowotworem kobiet i stanowi wiodącą przyczynę zgonów wśród pacjentek chorujących na nowotwory ginekologiczne. Wczesna diagnoza jest trudna, przede wszystkim z powodu bezobjawowego przebiegu choroby w jej wczesnych stadiach, braku objawów specyficznych i markerów diagnostycznych. U około 70% pacjentek chorobę rozpoznaje się w stadium zaawansowanym, z obecnością przerzutów. U większości chorych obserwuje się dobrą odpowiedź na standardową chemioterapię opartą na taksanach i związkach platyny, ale u znacznej liczby pacjentek dochodzi do nawrotu choroby i rozwoju oporności na dotychczas stosowane chemioterapeutyki. Zjawiska te mają związek z nowotworowymi komórkami macierzystymi, których cechy zapewniają im oporność na wspomniane terapie cytotoksyczne. Od pierwszej publikacji opisującej komórki macierzyste w raku jajnika minęło prawie 20 lat i choć od tamtego czasu pojawiło się wiele propozycji zdefiniowania ich

fenotypu, to do dziś nie został on jednoznacznie określony, co utrudnia opracowanie ukierunkowanych na nie terapii. W nurt tych poszukiwań wpisuje się praca doktorska mgr. Mariusza Kulińczaka, w ramach której ocenił on in vitro wpływ dwóch znanych związków z grupy biguanidów, fenforminy i metforminy, na komórki o cechach nowotworowych komórek macierzystych w raku jajnika.

Przedstawiona mi do recenzji Praca doktorska to bardzo obszerna, 300-stronicowa monografia napisana w języku polskim i podzielona na typowe dla tego typu dysertacji rozdziały: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz skrótów, Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Podsumowanie i bogata Bibliografia. Rozdziały te poprzedza wykaz skrótów stosowanych w pracy. Cała rozprawa jest bogato ilustrowana: zawiera aż 92 ryciny, w znaczącej mierze stanowiące ilustrację uzyskanych wyników, które ułatwiają ich zrozumienie i bardzo ułatwiają śledzenie narracji Doktoranta. Rozprawa została przygotowana bardzo starannie, napisana jest przejrzysto poprawnym, barwnym i bogatym językiem polskim.

W teoretycznym Wstępie do rozprawy Doktorant zawarł cztery podrozdziały, w których przedstawił czytelnikowi kontekst wymagany do pełnego zrozumienia przeprowadzonych przez niego doświadczeń, analiz i dyskusji. Każdy z wymienionych podrozdziałów stanowi zwięzłe, ale nie pobieżne wprowadzenie do problematyki rozprawy, a także uzasadnienie podjętych badań i pokazuje swobodę w poruszaniu się mgr Mariusza Kulińczaka zwłaszcza w obrębie tematyki nowotworowych komórek macierzystych w raku jajnika. Omawiając kolejno zagadnienia dotyczące komórek nowotworowych o cechach komórek macierzystych, epidemiologię, czynniki ryzyka i metody leczenia raka jajnika, Doktorant przedstawił przesłanki do stosowania związków z grupy biguanidów w leczeniu nowotworów. W mojej ocenie trochę zbyt słabo wybrzmiało w tym rozdziale znaczenie, jakie dla rozwoju nowych metod leczenia ma wykorzystanie znanych leków, w tym wypadku zwłaszcza stosowanej od kilkadziesiąt lat jako lek przeciwcukrzycowy metforminy. Strategia repozycjonowania pozwala znacznie skrócić czas i koszty badań koniecznych do rejestracji w nowym wskazaniu, co ma niebagatelne znaczenie przede wszystkim dla chorych.



W Materiałach i Metodach Doktorant opisał cztery referencyjne linie komórkowe raka jajnika wykorzystane w badaniach oraz metodykę badań. W tej części rozprawy zawarte jest także uzasadnienie dla zastosowanych stężeń cisplatyny. Doktorant dokonał tego wyboru w trakcie badań wstępnych, których wyniki nie są prezentowane w rozprawie. Nie wiadomo zatem, czy wrażliwość linii komórkowych na cisplatynę określona została na podstawie parametru IC50, IC80 czy IC90, a może innego parametru wykorzystywanego do określenia aktywności biologicznej chemioterapeutyków. Zastrzeżenie mam również do stężeń metforminy i fenforminy zastosowanych w pracy. Przestanki do stosowania metforminy i fenforminy w leczeniu nowotworów pochodzą z obserwacji klinicznych: oba te przeciwcukrzycowe leki mają dobrze poznany profil farmakokinetyczno-farmakodynamiczny. Wiadomo, że stężenie metforminy we krwi u chorych z cukrzycą waha się najczęściej od 4 μM do 15 μM i nie przekracza 30 μM (cytuję „Metformin, at Concentrations Corresponding to the Treatment of Diabetes, Potentiates the Cytotoxic Effects of Carboplatin in Cultures of Ovarian Cancer Cells” R. Erices et al., *Reprod Sci.* 2013 20(12), 1433), a dla fenforminy wartości te wynoszą około 1 μM (cytuję „The Mechanism of Action of Biguanides: New Answers to a Complex Question. L. Di Magno et al., *Cancers* 2022, 14(13), 3220). Nie jest jasne, dlaczego do oceny efektów działania tych leków in vitro Doktorant wybrał bardzo wysokie 0,5 mM stężenie, wielokrotnie przewyższające wartości obserwowane we krwi pacjentów zwłaszcza, że są dane literaturowe sugerujące, że in vitro efekt przeciwnowotworowy metforminy obserwowany jest przy stężeniach odpowiadających wartościom obserwowanym po podaniu jej pacjentom (cytuję „Metformin, at Concentrations Corresponding to the Treatment of Diabetes, Potentiates the Cytotoxic Effects of Carboplatin in Cultures of Ovarian Cancer Cells.” R. Erices et al., *Reprod Sci.* 2013 Dec; 20(12): 1433). W rozprawie znalazłam informację wskazującą, że wybór stężenia metforminy i fenforminy dokonany został w oparciu o wyniki badań wstępnych, które nie są przedstawione w pracy i w oparciu o dane literaturowe, ale też nie wiadomo, z jakich publikacji pochodzą te dane. Zupełnie nieprzekonujący jest także argument uzasadniający zastosowanie jednakowego stężenia dla obu badanych substancji. Doktorat zwraca uwagę na to, że związki te różnią się aktywnością, dlaczego zatem nie powinno być to wzięte pod uwagę przy porównaniu efektów ich działania? Taka strategia



jest też niespójna z wspomnianym już wcześniej wyborem stężeń cisplatyny: Doktorant zaznaczył, że ze względu na różną wrażliwość linii komórkowych na cisplatynę w doświadczeniach zastosował różne dawki tego cytostatyku, czyli postąpił zupełnie inaczej niż przy wyborze stężeń metforminy i fenforminy. Wybór stężenia leku do badań in vitro zawsze jest kompromisem wynikającym z niedoskonałości modeli komórkowych, natomiast ma on krytyczne znaczenie dla poprawnej interpretacji uzyskanych wyników i potencjalne implikacje kliniczne i powinien być bardzo rzetelnie uzasadniony. Moje wątpliwości dotyczące poprawności wyboru stężeń pozostawiam do rozstrzygnięcia Doktorantowi.

Kluczowym elementem rozprawy są wyniki, które są imponujące. Doktorant przedstawił w nich między innymi wpływ krótkotrwałej, 6-dniowej ekspozycji komórek czterech linii raka jajnika na metforminę lub fenforminę oceniając ich wpływ na proliferację, migrację, klonogenność, wrażliwość na cisplatynę, markery powierzchniowe oraz poziom ekspresji wybranych genów uznawanych za wyznaczniki macierzystości lub/i agresywności komórek nowotworowych. Ponadto, Doktorant zbadał wpływ fenforminy na jedną z analizowanych linii komórkowych w warunkach długotrwałej hodowli (do 229 dni) analizując między innymi globalny profil ekspresji genów z użyciem metody sekwencjonowania następnej generacji i przeprowadzając analizy ontologiczne. Wyniki są przedstawione w czternastu podrozdziałach według zastosowanej metody badawczej. W części podrozdziałów Doktorant przedstawił swoje obserwacje w punktach, co jest zrozumiałe przy tak dużej liczbie eksperymentów prowadzonych w różnych warunkach. Wyniki przedstawione są w sposób przejrzysty i są bardzo bogato ilustrowane, co znacząco ułatwia ich lekturę. Pozostając pod ogromnym wrażeniem liczby przeprowadzonych doświadczeń, ich rygorystycznej analizy statystycznej i krytycznej oceny ponownie chciałabym zwrócić uwagę na lukę, jaką stanowi brak danych z doświadczeń wstępnych przeprowadzonych przez Doktoranta. Brak informacji o zakresie niecytotoksycznych stężeń metforminy i fenforminy powoduje, że łatwo można byłoby postawić zarzut, że na przykład obniżenie tempa proliferacji, potencjału klonogennego oraz migracji komórek wszystkich czterech badanych linii jajnika hodowanych w obecności fenforminy wynika ze zbyt wysokiego stężenia tego leku.

Kolejny rozdział dysertacji doktorskiej zatytułowany został „Dyskusja wyników” i podzielony został na podrozdziały według takiego samego schematu jak dwa poprzednie rozdziały. Każdy z podrozdziałów zawiera dyskusję uzyskanych wyników w świetle danych literaturowych, jest ona przemyślana i zakończona Wnioskami oraz Podsumowaniem.

Zgadzam się z Doktorantem, że o potencjale biguanidów, przede wszystkim metforminy, stosowanych w skojarzeniu z innymi związkami w terapiach przeciwnowotworowych świadczy między innymi kilkadziesiąt prowadzonych na całym świecie badań klinicznych. Mimo moich wątpliwości dotyczących stężeń leków zastosowanych w eksperymentach, wartość poznawcza i praktyczna uzyskanych wyników jest nie do przecenienia. Do najważniejszych osiągnięć pracy zaliczam dogłębne scharakteryzowanie zmian zachodzących w komórkach nowotworowych hodowanych w warunkach standardowych i w obecności fenforminy oraz ujawnienie wpływu tego związku na proces biosyntezy lipidów.

Podsumowując, oceniam rozprawę doktorską mgr. Mariusza Kulińczaka pozytywnie. Doktorant podjął oryginalny problem badawczy i właściwie go rozwiązał. Bogactwo i rozmiar materiału empirycznego oraz wielość wątków poruszonych w rozprawie jest wyrazem dociekliwości badawczej Autora, jego przygotowania warsztatowego oraz umiejętności zaplanowania i przeprowadzenia dużego projektu z dbałością o prezentację wyników badania. Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018 poz. 1668 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr. Mariusza Kulińczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katarzyna Koział