

Samodzielna Pracownia Diagnostyki i Immunologii Nowotworów

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

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

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

Lublin 05.01.2021 r.

OCENA

**rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Tudrej
pt. „Charakterystyka molekularna i funkcjonalna modelowych
linii komórkowych raka jajnika *in vitro*”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Patrycji Tudrej 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. Wykonane prace eksperymentalne były finansowane w ramach grantów Narodowego Centrum Nauki: *HARMONIA 2012/04/M/NZ2/00133* oraz *STRATEGMED2/266766/17/NCBR/215*, których kierownikiem była Pani prof. dr hab. n. med. Katarzyna Lisowska oraz dwóch projektów stypendialnych dla doktorantów: „*DoktoRIS-Program Stypendialny na rzecz innowacyjnego Śląska*” współfinansowanego przez Unię Europejską oraz *Studium Doktoranckiego Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie- Państwowego Instytutu Badawczego*.

W ciągu ostatnich lat immunologia i immunoterapia nowotworów, w tym raka jajnika (OC) są w centrum zainteresowania naukowców na całym świecie. W szczególności gwałtowny rozwój technik biologii molekularnej, a zwłaszcza sekwencjonowania ludzkiego genomu czy genomu nowotworów tzw. (*The Cancer Genom Atlas Project*) doprowadził do wykrycia różnic w genotypie i immunofenotypie pomiędzy poszczególnymi typami histologicznymi nowotworów, w tym raka jajnika. Wykazano, że guzy diagnozowane jako rak jajnika są heterogenną grupą nowotworów, które charakteryzują się odrębną histogenezą, odmiennym torem mutacyjnym oraz zróżnicowanym przebiegiem klinicznym.

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.

Modelem najczęściej wykorzystywanym w badaniach podstawowych i przedklinicznych w raku jajnika są linie komórkowe hodowane w warunkach *in vitro*. Są one skatalogowane w bazach takich jak *The Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)* oraz *The Cancer Genom Atlas (TCGA)*. Jednakże, jak podkreśla doktorantka w jednej z prac poglądowych pt. *Characteristics of in vitro model systems for ovarian cancer studies, Oncol. Clin. Pract. 2019,5:246-259*, wiele stosowanych linii komórkowych OC ma niestety niejasne lub błędnie zdefiniowane pochodzenie histologiczne. Wykonywane współcześnie analizy molekularne kwestionują ich dotychczasową klasyfikację. Spostrzeżenie to jest szczególnie istotne w odniesieniu do najczęściej wykrywanego i najbardziej agresywnego typu surowiczego OC o niskim stopniu zróżnicowania histologicznego (*high-grade serous ovarian carcinoma, HGSOC*). Dlatego też wykrycie wiarygodnego modelu HGSOC i jego dokładne scharakteryzowanie jest niezwykle istotne dla wyboru postępowania klinicznego jak i poszukiwania nowych celów terapeutycznych dla chorych na raka jajnika.

W związku z powyższym tematyka dysertacji mgr Patrycji Tudrej dotyczy wielce istotnych zagadnień i wskazuje potrzebę weryfikacji i analiz, które mogą znaleźć w przyszłości przełożenie na wydłużenie całkowitego czasu przeżycia pacjentek z HGSOC.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „Charakterystyka molekularna i funkcjonalna modelowych linii komórkowych raka jajnika *in vitro*” posiada układ typowy dla dysertacji doktorskich przedstawianych w formie zbioru prac. Zbiór ten stanowią trzy powiązane tematycznie artykuły naukowe, z czego jeden to praca oryginalna (*International Journal of Molecular Science 2018*) i dwie prace poglądowe (*Cancer Chemotherapy and Pharmacology 2018, Oncology in Clinical Practice 2019*) oraz dwa doniesienia konferencyjne opublikowane w latach 2015-2019. Łączny współczynnik IF wymienionych prac wynosi ponad 10, zaś punktacja MNiSW równa się 340 punktów. W pracach tych mgr Patrycja Tudrej jest pierwszym bądź drugim autorem, co świadczy o jej istotnym udziale w powstaniu publikacji. Wkład doktorantki obejmował koncepcję i założenia badań, ich wykonanie oraz przygotowanie manuskryptów do druku. Wszyscy współautorzy jednomyślnie uznali wiodącą rolę badawczą mgr Patrycji Tudrej w przeprowadzonych eksperymentach oraz przygotowaniu publikacji poglądowych opartych na przeglądzie literatury, dotyczących najnowszych metod terapii raka jajnika.

Rozprawa doktorska pt. „Charakterystyka molekularna i funkcjonalna modelowych linii komórkowych raka jajnika *in vitro*” liczy 106 stron i ma układ typowy dla tego typu opracowań. Zawiera wykaz skrótów, listę publikacji, założenia i cel pracy, omówienie opublikowanych prac przeglądowych i eksperymentalnych wchodzących w skład rozprawy, podsumowanie, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo. W dysertacji autorka umieściła pełne teksty publikacji stanowiących rozprawę oraz oświadczenia współautorów.

Mgr Patrycja Tudrej za cel pracy postawiła sobie wykonanie szczegółowej charakterystyki pięciu popularnych modeli komórkowych raka jajnika (OVCAR3, SKOV3, OAW42, A2780, ES2) celem oceny ich przydatności w badaniach podstawowych i przedklinicznych poszczególnych typów histologicznych OC. Niezwykle ciekawe a zarazem zaskakujące są obserwacje i wnioski doktorantki dotyczące błędnej klasyfikacji ogólnie dostępnych modeli linii komórkowych OC. Analizując pochodzenie poszczególnych modeli mgr Tudrej wykazała, że linie OVCAR3, SKOV3, OAW42 mają pochodzenie mullerowskie i wykazują ekspresję białka PAX8. Analiza immunofenotypu linii OVCAR3 potwierdza cechy surowiczego OC. Analizując profil mutacyjny autorka wykazała, że modele SKOV3, OAW42, A2780 mają cechy raków endometrioidalnych i jasnokomórkowych, natomiast OVCAR3 ma cechy raka surowiczego (HGSOC). Co interesujące określony przez mgr Tudrej profil mutacyjny linii ES2 nie pozwala na przypisanie jej do konkretnego typu histologicznego OC. Doktorantka wykazała ponadto, że linie OAW42, SKOV3 opisywane w literaturze jako modele surowicze mają fenotyp raka endometrioidalnego. Linia ES2 klasyfikowana jako rak surowiczy lub jasnokomórkowy wg badań mgr Tudrej posiada cechy raka jasnokomórkowego. Analizy doktorantki wykazały, że jedynie cechy linii OVCAR3 odpowiadają surowiczemu OC o niskim stopniu zróżnicowania histologicznego (HGSOC).

Doktorantka wywiązała się doskonale z podjętego zadania scharakteryzowania poszczególnych modeli komórkowych raka jajnika. Analizy wykonane przez mgr Tudrej dowiodły, że wśród najczęściej wykorzystywanych w badaniach modelach linii komórkowych OC, nie ma dobrego modelu OC surowiczego o niskim stopniu zróżnicowania histologicznego (HGSOC), który jest najczęściej wykrywanym i wysoce agresywnym typem histologicznym tego nowotworu. Dlatego też szczególnie wysoko oceniam podjęty przez doktorantkę cel wyprowadzenia linii komórkowej surowiczego HGSOC z płynu otrzewnowego pacjentki z tym typem histologicznym nowotworu.

Oryginalnym i nowatorskim osiągnięciem mgr Patrycji Tudrej jest wyprowadzenie i scharakteryzowanie nowej linii komórkowej raka jajnika OVPA8, stanowiącej model surowiczego OC o niskim stopniu zróżnicowania histologicznego (HGSOC), który został przekazany do dwóch ogólnodostępnych repozytoriów: ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures) oraz DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

Kandydatka niewątpliwie wykazała bardzo dobre przygotowanie teoretyczne oraz doskonale opanowanie warsztatu badawczego. Wysoko oceniam zastosowanie w badaniach różnorodnych, nowoczesnych technik laboratoryjnych takich jak: łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), metoda fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), sekwencjonowanie nowej generacji (NGS), analiza immunocytochemiczna (cytospin), testy do oceny zdolności do tworzenia klonów, testy do oceny migracji w systemie transwell i inwazji w macierzy. Dzięki tym metodom doktorantka scharakteryzowała morfologię, profil molekularny a także funkcjonalny badanych modeli komórkowych.

Wykonanie ambitnych, pracochłonnych i czasochłonnych etapów eksperymentu, nie budzi żadnych zastrzeżeń. Autorka szczegółowo opisuje wykonanie poszczególnych etapów oznaczeń, co dowodzi rzetelności wykonanych badań, a także umożliwia ich powtórzenie. Doktorantka w pełni zrealizowała postawione cele badawcze.

Przedłożony do oceny manuskrypt napisany jest w sposób przejrzysty i logiczny. Opracowanie poszczególnych rozdziałów ma bardzo czytelną konstrukcję. Wprowadzenie porusza wszystkie ważne aspekty omawiane w dysertacji. Praca jest napisana poprawnym językiem, zawiera nieliczne błędy edytorskie. Dla przykładu jeden z nich spowodował zmianę nazwy genu (np. str. 18, tabela 1, „**HRAS**” zamiast *KRAS*, podobnie str.19 drugi akapit).

Uwagę recenzenta zwróciły pewne nieścisłości, które wymagają wyjaśnienia/doprecyzowania:

1. Na str. 14 autorka pisze „po postawieniu **pierwszego rozpoznania**, pacjentka została poddana obustronnemu usunięciu przydatków”

Pytanie do autorki: O jakie rozpoznanie chodzi?

2. Z opisu metodyki dotyczącej pozyskania płynu otrzewnowego (PF), z którego izolowano komórki i wyprowadzono linię raka jajnika OVPA8, wynika, że PF pobierano przed pierwszym zabiegiem operacyjnym.

Pytanie do autorki: W jaki sposób pobrany płyn otrzewnowy był zabezpieczony do dalszych etapów eksperymentu? Wiadomo bowiem, że wiarygodny wynik oceny histopatologicznej pacjentka otrzymuje zwykle kilka tygodni po zabiegu usunięcia guza. Zatem przed zabiegiem operacyjnym nie wiemy jaki typ histologiczny OC występuje u pacjentki?

3. Na czym polega metoda selektywnej trypsynizacji?

WNIOSKI KOŃCOWE

Podsumowując pragnę podkreślić, że przedstawiona do recenzji praca mgr Patrycji Tudrej pt. „Charakterystyka molekularna i funkcjonalna modelowych linii komórkowych raka jajnika *in vitro*” jest opracowaniem bardzo ważnego problemu medycznego. Doktorantka ambitnie podeszła do realizacji zadań badawczych. Wykazała duże umiejętności prowadzenia eksperymentalnych badań naukowych, zdolności interpretacji wyników oraz wyciągania wniosków. Recenzowana dysertacja posiada oryginalny aspekt poznawczy. Praca pt. „Charakterystyka molekularna i funkcjonalna modelowych linii komórkowych raka jajnika *in vitro*”, spełnia wszystkie wymogi merytoryczne i formalne stawiane rozprawom doktorskim.

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 Patrycji Tudrej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom merytoryczny prac stanowiących rozprawę, mam również przyjemność złożyć wniosek o wyróżnienie pracy.

dr hab.n.med. Iwona Wertel, prof. uczelni

Dr hab. n.med. Iwona Wertel
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
Al. Raclawickie 1, 20-059 Lublin
tel. 885-151-151



