

Warszawa 7 kwietnia 2023 r.

dr hab. n .med. Magdalena Chechlińska, prof. NIO
Zakład Biologii Nowotworów

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Filipiak-Duliban
pt.: „Modele 3D jako alternatywne metody badań lekooporności nowotworów”.**

Praca doktorska mgr Aleksandry Filipiak-Duliban pt.: „Modele 3D jako alternatywne metody badań lekooporności nowotworów”, przygotowana pod kierunkiem prof. dr hab. Claudine Kiedy oraz promotora pomocniczego dr Klaudii Brodaczewskiej, dotyczy aktualnej i ważnej problematyki badania mechanizmów lekooporności nowotworów i poszukiwania modeli do takich badań.

Przedłożona mi do oceny praca ma formę opatrzonego wstępem zbioru 2 prac opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Liczy 69 stron, w tym, poza spisem treści, wykazem skrótów, wstępem, wnioskami i piśmiennictwem oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim, zawiera kopie publikacji, wymaganych oświadczeń współautorów oraz informację o źródłach finansowania badań.

Doktorantka sformułowała hipotezę, że trójwymiarowe modele *in vitro* guzów nowotworowych naśladują guzy *in vivo* i mogą stanowić lepsze niż hodowle dwuwymiarowe narzędzie do badań nad lekoopornością. Aby zweryfikować tę hipotezę, po zoptymalizowaniu warunków uzyskiwania sferoidów (3D) mysich komórek dwóch linii nowotworowych: raka nerki (RenCa) i czerniaka (B15F10), scharakteryzowała hodowle 2D i 3D, utrzymywane w warunkach normoksji i hipoksji, pod kątem następujących parametrów: wielkość (w przypadku sferoidów), żywotność i potencjał proliferacyjny komórek, fazy cyklu komórkowego, ekspresja genów i białek związanych z hipoksją, ekspresja markerów macierzystości oraz przejścia epithelialno-mezenchymalnego. Wyniki otrzymane w hodowlach 3D porównywane były również do uzyskanych w syngenicznych mysich modelach raka nerki i czerniaka. Ponadto za pomocą sekwencjonowania nowej generacji (NGS) analizowano transkryptom komórek hodowanych w postaci kultur dwu- i trójwymiarowych w warunkach normoksji i hipoksji. Wyniki zostały opublikowane w pierwszej z dwóch publikacji zbioru. W drugiej pracy Doktorantka badała, czy i na drodze jakich mechanizmów warunki 3D wpływają na odpowiedź komórek na trzy powszechnie stosowane chemioterapeutyki o różnych mechanizmach działania. W tym celu prowadziła hodowle 2D i 3D wyżej wymienionych mysich linii komórkowych, w obecności poszczególnych leków w różnych stężeniach. W celu oceny wrażliwości na leki badała żywotność komórek wraz z dystrybucją leków w obrębie sferoidów, a następnie oceniała ekspresję transportera ksenobiotyków: białka MDR1 (multi drug resistance 1), ekspresję mTOR – regulatora proliferacji, różnicowania i apoptozy na poziomie genu i białka oraz za pomocą NGS badała profile ekspresji genów.

Cele badań zostały sformułowane poprawnie, zastosowano prawidłowe nowoczesne metody, które umożliwiły całościowe rozwiązanie postawionych problemów badawczych, przeprowadzone doświadczenia zaplanowano i przeprowadzono właściwie. Wnioski opisane w publikacjach opierają się na dobrze przeanalizowanych i zinterpretowanych wynikach.

Praca zawiera elementy oryginalne, takie jak: scharakteryzowanie sferoidów raka nerki w porównaniu do znanego wcześniej modelu czerniaka i wykazanie analogicznych zmian wybranych markerów EMT i macierzystości w syngenicznym modelu guzów *in vivo* oraz wskazanie ważnych elementów mechanizmów oporności na leki, które to mechanizmy mogą być wspólne (zmiany ekspresji genów cytochromu P450 kodujących enzymy związane z metabolizmem ksenobiotyków) lub mogą różnić modele w zależności od typu komórek nowotworowych tworzących sferoid (nadekspresja MDR1 w sferoidach raka nerki). Wniosek ogólny z pracy jest potwierdzeniem prawdziwości postawionej hipotezy, mianowicie Doktorantka wykazała, że w większości kombinacji, w modelu 3D komórki nowotworów wykazywały większą niż w modelu 2D oporność na leki, tj. ewerolimus, cisplatynę i doksorubicynę, w przypadku czerniaka, i na doksorubicynę w przypadku komórek raka nerki.

Streszczenie w języku angielskim jest poprawne i koresponduje z treścią streszczenia w języku polskim.

Przedłożona mi do oceny poprawiona praca zawiera bardzo wiele błędów merytorycznych, terminologicznych i edytorskich. Dotyczy to przede wszystkim polskiej części pracy, czyli stron 4-21 i str. 58.

Na stronie 4 Autorka przedstawiła „wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską”, w którym znalazły się 3 pozycje, podczas gdy przedstawiony na str. 23-57 zbiór to dwie publikacje.

Wykaz skrótów jest niekompletny, brakuje np. P-gp i GSH.

Bardzo proszę, aby Doktorantka odniosła się podczas obrony do następujących kwestii merytorycznych.

Doktorantka pisze o raku skóry w kontekście czerniaka (str. 10). Wydaje się, że nie widzi różnicy między pojęciami „rak” i „nowotwór złośliwy” i uznaje, że czerniak to rak.

Czy „czynniki genetyczne”, o których Doktorantka pisze na str. 9, to wyłącznie mutacje somatyczne?

Na str. 11 Doktorantka pisze „do macierzy zewnątrzkomórkowej [...] zaliczamy: kolagen, fibronektyny, lamininy, witronektyny, tenascyny-C, cytokiny, hormony, czynniki wzrostu oraz wiele innych”. Nie można powiedzieć, że cytokiny, czy hormony stanowią macierz komórkową, one tam są i nawet mogą się gromadzić, ale nie „zaliczamy” ich do macierzy zewnątrzkomórkowej. Podobnie w publikacji drugiej, do komponentów mikrośrodowiska nowotworów autorzy nieprawidłowo zaliczyli hipoksję, która oczywiście tam występuje, ale nie jest to „składnik” a cecha.

Na str. 15 czytamy: „Silny wpływ na przerzutowanie przede wszystkim wywiera nasilające się niedotlenienie oraz niedożywienie komórek nowotworowych, czyli stan hipoksji”. Stan hipoksji oznacza jedynie niedotlenienie. Dalej Autorka pisze „Do tych zmian dochodzi stopniowo, komórki zaczynają wykazywać pośrednie cechy morfologiczne, transkrypcyjne i epigenetyczne, zarówno o charakterze nabłonkowym jak i mezenchymalnym, w różnych stanach inwazyjnych”.

Po pierwsze nie ma „cech transkrypcyjnych”, po drugie, co to są „stany inwazyjne”, chyba chodziło o stopnie zaawansowania, ew. „stadia inwazji”.

W celu pracy Doktorantka pisze, że „zastosowano różniące się od siebie modele komórkowe dwóch typów nowotworów – czerniaka (B16F10) oraz raka nerki (RenCa)”, podczas gdy zastosowała takie same modele, tj. sferoidy, różnych nowotworów.

W publikacji pierwszej napisano: „...we decided to perform research on 3D cultures maintained in normoxia which seems to more appropriately reconstitute the natural development of tumor.” Jest to stwierdzenie niezgodne z obecną wiedzą na temat guzów nowotworowych, chyba że mówimy o objętościach mniejszych niż 1mm³. Sami autorzy, w tym Doktorantka, we wstępie do drugiej publikacji wskazują na hipoksję jako cechę mikrośrodowiska guzów.

Po co w publikacji pierwszej wykonano sekwencjonowanie, do wyników którego odniesiono się zdawkowo jedynie w dyskusji, i co ono wniosło?

Co w publikacji pierwszej znaczy zdanie „RenCa cells were shown to have partly mutated whose impact on p53 expression has not been proven”.

Na stronie 58 doktorantka podsumowuje wyniki i przedstawia wnioski. Zostało to ujęte w sposób nieuporządkowany, wyniki pomieszano z wnioskami, bez logicznego uzasadnienia. Niektóre sformułowania budzą zastrzeżenia, np. „sferoidy nowotworu skóry wykazują mniejszą wrażliwość na ewerolimus, cisplatynę i doksorubicynę, dla nowotworu nerki obserwowano niską wrażliwość tylko na doksorubicynę”, mniejszą niż co? Pomimo to stwierdzam, że podsumowanie koresponduje z rezultatami badań, a wnioski odpowiadają celowi pracy.

Wstęp w języku polskim jest bardzo powierzchowny, np. przedstawiając zagadnienie rozwoju nowotworów Doktorantka odnosi się tylko do jednej z teorii, opisując komórki mikrośrodowiska guzów, nie wyjaśnia co to są limfocyty Th1/Th2, alternatywne modele badań nowotworów są jedynie zasygnalizowane, leki, które użyła w eksperymentach w ogóle nie zostały opisane, natomiast nie wiadomo po co nadmiernie rozwija np. opis choroby von Hippel-Lindau. W niektórych fragmentach wstęp wydaje się polską kalką prac innych autorów, np. cytowanej pracy przeglądowej Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L: 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. Int J Mol Sci 2021, 22(22). Użyte sformułowania są często wyłącznie ogólnikowe, na poziomie artykułu gazetowego. Doktorantka stosuje nieprawidłową terminologię, jak np.:

„zdrowe tkanki” powinno być „tkanki prawidłowe”

„normalne komórki” powinno być „komórki prawidłowe”

„terapię antynowotworową” powinno być „terapię przeciwnowotworową”

„komórki rakowe” powinno być „komórki raka” lub „komórki nowotworowe”

„leczenie chemioterapią” powinno być np.: „leczenie chemiczne”

„metastazy” – powinno być „przerzuty”

„fizjologia raka” – w odniesieniu do stanów zaburzeń mówimy raczej „patofizjologia”

„tkanki nowotworowe” – nie istnieje taka tkanka, pomimo że taki termin istnieje po angielsku

„kwaśne pH”, kwaśne może być środowisko, pH może być niskie

Ponadto w publikacji pierwszej pojawia się „melanoma cancer”, powinno być „melanoma”.

Język polskiego wstępu jest nie do zaakceptowania. Praktycznie na każdej stronie jest szereg błędów stylistycznych, gramatycznych i interpunkcyjnych, a nawet ortograficznych. Wygląda

to jakby Doktorantka nie przeczytała swojej pracy, na co wskazuje również wspomniana już wyżej pomyłka w liście prac stanowiących zbiór.

W publikacjach również można zauważyć pewien (na szczęście znacznie mniejszy) brak dbałości, co pokazuje m.in. zacytowane wyżej zdanie, a nawet przeoczony zabawny błąd edytora, który to błąd powinien być wychwycony na etapie korekty szczytów przez autorów publikacji, mianowicie, w nagłówku pierwszej publikacji jako pierwszy autor widnieje „Aleksandra et al.”. Zakres błędów w publikacjach nie wpływa jednak zasadniczo na ich ocenę merytoryczną.

Powyższe uwagi krytyczne dotyczą głównie treści wstępu i są również adresowane do promotora i promotora pomocniczego.

Zgodnie z brzmieniem zapisów ustawowych, rozprawę doktorską stanowi tutaj „zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych”, do którego „dołącza się streszczenie w języku angielskim”. **Jako podstawę wniosku końcowego recenzji uznaję więc jedynie publikacje wraz ze streszczeniami w języku polskim i angielskim.** Należy podkreślić, że w obu publikacjach Doktorantka miała znaczący udział, jest pierwszym autorem i zaprezentowała ogólną wiedzę w zakresie tematyki rozprawy, poprawnie sformułowała cel pracy, rozwiązała postawione problemy dobrze dobranymi metodami, wykazując się przy tym dobrym i bogatym warsztatem badawczym, zrealizowała cele pracy i przedstawiła wnioski, w których zawarła elementy oryginalne.

W związku z powyższym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Aleksandry Filipiak-Duliban spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018 poz. 1668) i zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie do dalszych etapów postępowania doktorskiego.