



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KATEDRA BIOTECHNOLOGII MEDYCZNEJ
ZAKŁAD IMMUNOLOGII NOWOTWORÓW

ul. Garbary 15
61-866 POZNAŃ

tel. +48-61 88-50-748; -665
fax +48-61 85-28-502

Poznań, 20 kwietnia 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Aleksandry Filipiak-Duliban

pt.: „Modele 3D jako alternatywne metody badań lekooporności nowotworów”

wykonanej

w Laboratorium Onkologii Molekularnej i Terapii Innowacyjnych,

Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie,

pod kierunkiem prof. dr. hab. Claudine Kieda

oraz

dr Klaudii Brodaczewskiej

W odpowiedzi na prośbę Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego podjąłem się recenzowania rozprawy doktorskiej autorstwa Pani mgr Aleksandry Filipiak-Duliban, zatytułowanej: „Modele 3D jako alternatywne metody badań lekooporności nowotworów”.

Choroby nowotworowe stanowią drugą najczęstszą przyczynę zgonów na świecie, w związku z tym są niezmiennie poważnym wyzwaniem dla współczesnej medycyny. Pomimo rozwoju tradycyjnych metod terapeutycznych, takich jak interwencja chirurgiczna, radio- czy chemioterapia, oraz wprowadzania nowych, takich jak terapia celowana czy immunoterapia, efekty leczenia w przypadku niektórych nowotworów pozostają wciąż niedostatecznie zadowalające.

Przyczyną takiego stanu rzeczy jest między innymi złożony charakter mikrośrodowiska, jakie rozwija się w obrębie organizmu w wyniku oddziaływania nowotworu. W skrajnych przypadkach nowotwór wraz otaczającym go mikrośrodowiskiem może być traktowany nawet jako tzw. tkanka nowotworowa, w skład której obok komórek nowotworowych wchodzi również komórki układu odpornościowego, tkanki łącznej i śródbłona oraz elementy niekomórkowe. Procesy zachodzące w obrębie mikrośrodowiska nowotworowego sprzyjają bezpośrednio wzrostowi guza, a także blokując przeciwnowotworową aktywność układu odpornościowego, mogą wspierać jego ucieczkę spod nadzoru immunologicznego w sposób pośredni. Ten wyjątkowo adaptacyjny charakter mikrośrodowiska nowotworu nie tylko ułatwia wzrost samego guza, ale także w istotny sposób utrudnia jego eliminację. W wielu przypadkach u pacjentów poddanych terapiom przeciwnowotworowym rozwija się lekooporność. W tym świetle ogromnie trudne jest stworzenie takiego modelu badawczego, który odzwierciedlałby warunki panujące w obrębie mikrośrodowiska nowotworowego.

Standardowe modele służące badaniu nowotworów, pomimo ich powszechności stosowania ze względu na swoją prostotę i niski koszt, są dalece niewystarczające. W związku z powyższym wykreowanie takiego modelu, który znacznie przybliży odwzorowanie naturalnych mechanizmów w warunkach *in vitro* jest tak bardzo pożądane.

Dlatego próba opracowania przez Doktorantkę prostego i uniwersalnego trójwymiarowego modelu, imitującego zjawiska zachodzące w mikrośrodowisku guza, stanowi poważne wyzwanie badawcze. Zarazem jest istotna z punktu widzenia poznawczego, ale także praktycznego, ponieważ może zwiększyć efektywność interwencji farmaceutycznej lub terapeutycznej.

Dysertacja została napisana w postaci wielostronicowego komentarza do zbioru trzech powiązanych ze sobą tematycznie artykułów opublikowanych w latach 2021-2022:

1. Aleksandra Filipiak-Duliban, Klaudia Brodaczewska, Aleksandra Majewska, Claudine Kieda: Spheroid culture models adequately imitate distinctive features of the renal cancer or melanoma microenvironment. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 2022 May;58(5):349-364. doi: 10.1007/s11626-022-00685-8 (IF 2,723; MNiSW 70)
2. Aleksandra Filipiak-Duliban, Klaudia Brodaczewska, Arkadiusz Kajdasz, Claudine Kieda: Spheroid Culture Differentially Affects Cancer Cell Sensitivity to Drugs in Melanoma and RCC Models. *International Journal of Molecular Sciences* 2022 Jan 21;23(3):1166. doi: 10.3390/ijms23031166 (IF 6,208; MNiSW 140)
3. Raefa Abou Khouzam, Klaudia Brodaczewska, Aleksandra Filipiak, Nagwa Ahmed Zeinelabdin, Stephanie Buart, Cezary Szczylik, Claudine Kieda, Salem Chouaib: Tumor Hypoxia Regulates Immune Escape/Invasion: Influence on Angiogenesis and Potential Impact of Hypoxic Biomarkers on Cancer Therapies. *Frontiers in Immunology* 2021 Jan 20;11:613114. doi: 10.3389/fimmu.2020.613114 (IF 8,787; MNiSW 140)

W pierwszej pracy z prezentowanego cyklu: "*Spheroid culture models adequately imitate distinctive features of the renal cancer or melanoma microenvironment*", porównano modele hodowli sferoidów z guzami otrzymanymi w hodowlach *in vivo*. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy stwierdzili, że wykorzystane w badaniach modele hodowli 3D imitują cechy nowotworów, takie jak inicjację stanu hipoksji czy indukcję powstawania nowotworowych komórek macierzystych (CSC). Ponadto, w zależności od progresji nowotworu model jasnokomórkowego raka nerki preferencyjnie indukował powstawanie CSC, natomiast model czerniaka złośliwego sprzyjał przejściu epithelialno-mezenchymalnemu (EMT). W konkluzji podkreślono, że zastosowany model sferoidowy, przynajmniej we wstępnej fazie eksperymentów, może służyć jako alternatywa dla badań z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych.

Drugi artykuł: "*Spheroid Culture Differentially Affects Cancer Cell Sensitivity to Drugs in Melanoma and RCC Models*", opisuje proces walidacji opracowanego eksperymentalnego modelu sferoidowego hodowli 3D, podczas którego testowano chemioterapeutyki oraz przeprowadzono analizę przypuszczalnych mechanizmów odpowiadających za lekooporność nowotworów. Autorzy zaobserwowali różny stopień wrażliwości wykorzystanych w badaniach modeli na obecność doksorubicyny, ewerolimusu i cisplatyny. Testowane modele różniły się między sobą w zakresie ekspresji białek odpowiedzialnych za lekooporność, MDR1 i Cyp2s1.

W podsumowaniu autorzy stwierdzili, że zaproponowane przez nich hodowle sferoidów mogą być wykorzystane do badań *in vitro* z użyciem komórek pobranych od pacjentów i służyć jako narzędzie dla medycyny spersonalizowanej.

Trzecia publikacja wchodząca w skład cyklu: „*Tumor Hypoxia Regulates Immune Escape/Invasion: Influence on Angiogenesis and Potential Impact of Hypoxic Biomarkers on Cancer Therapies*” jest pracą poglądową traktującą o hipoksji w mikrośrodowisku nowotworu i jej wpływie na proces angiogenezy, przeciwnowotworową odpowiedź układu odpornościowego, normalizację naczyń krwionośnych oraz wykorzystanie biomarkerów hipoksji w strategiach normalizacji naczyń.

Dostępny dorobek naukowy doktorantki obejmuje artykuły opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, wprawdzie jest niewielki, jednak spójny tematycznie. Mgr Aleksandra Filipiak-Duliban jest autorem pięciu artykułów indeksowanych w bazach Web of Science i PubMed, opublikowanych w latach 2021-2023, cytowanych łącznie pięćdziesiąt dziewięć razy. Współczynnik oddziaływania artykułów będących podstawą recenzowanej dysertacji doktorskiej wynosi odpowiednio 2,723, 6,208 i 8,787, co wskazuje na istotność opublikowanych badań. Sumaryczna wartość wskaźnika IF prezentowanego cyklu jest równa 17,718, a łączna punktacja, wg wykazu czasopism punktowanych Ministra Edukacji i Nauki, wynosi 350 punktów. Prace opublikowano w recenzowanych czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Warto podkreślić, że Doktorantka jest pierwszym autorem dwóch artykułów wchodzących w skład przedstawionej do oceny pracy doktorskiej. Zgodnie z oświadczeniami współautorów obu pierwszoautorских artykułów załączonych do pracy doktorskiej, jej udział w ich powstawaniu wynosił odpowiednio 58% i 60%. Polegał on na opracowaniu założeń pracy, opracowaniu modelu do badań, optymalizacji i przeprowadzeniu eksperymentów, analizie i interpretacji danych oraz napisaniu pierwowzoru manuskryptu.

Dysertacja została napisana zgodnie z typowym układem charakteryzującym prace naukowe. Rozprawa liczy 69 stron. Na wstępie autorka umieściła słowa kluczowe, wskazała źródła finansowania pracy i zamieściła wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską. Dalej w dysertacji zostały zawarte: wykaz skrótów oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. W trzynastostronicowym wstępie Doktorantka scharakteryzowała podstawy naukowe i podjęte problemy badawcze, skupiając się głównie na mikrośrodowisku guza, zjawisku hipoksji, progresji nowotworu i rozwojowi lekooporności oraz opisała standardowe i alternatywne modele badań nowotworów. We wstępie ulokowana została rycina ilustrująca schemat budowy mikrośrodowiska guza. Dalej Autorka wskazała założenia i cel rozprawy, przedstawiła przedruki prac oryginalnych stanowiących podstawę omawianej dysertacji. Podsumowanie wyników i wnioski zostały streszczone w formie dziesięciu punktów, które opatrzone syntetycznym komentarzem końcowym. Rozprawę uzupełnia 6 oświadczeń o wkładzie pracy poszczególnych współautorów wyrażających jednocześnie zgodę na wykorzystanie przez Panią magister Aleksandrę Filipiak-Duliban tych publikacji jako części rozprawy doktorskiej. Całość zamyka spis literatury obejmujący łącznie 83 pozycje piśmiennictwa.

Niewątpliwym sukcesem Doktorantki jest wykazanie, że trójwymiarowe sferoidowe hodowle mogą być istotne w badaniach nad fizjologią raka i stać się alternatywą dla metod standardowych, dzięki czemu mogą być potencjalnie wykorzystane do testów z zastosowaniem komórek pochodzących od pacjentów, jako łatwo dostępne narzędzie istotne klinicznie.

Postępowanie dowodowe opisane w załączonych do dysertacji publikacjach nie budzi wątpliwości. Bogata bateria testów laboratoryjnych łączących zarówno ocenę funkcjonalną, analizę ekspresji wybranych białek oraz odpowiadających im genów została wykorzystana w sposób celowy i rzetelny. Zostało to potwierdzone przez sam fakt przyjęcia manuskryptów przez recenzentów do publikacji w periodykach o ustalonej renomie.

Dla samej dysertacji zauważalnym jest brak załączenia przedruku pracy poglądowej opublikowanej w czasopiśmie *Frontiers in Immunology*, która została wymieniona jako trzecia praca cyklu w wykazie publikacji stanowiących pracę doktorską. W prawdzie dla samego celu dysertacji, czyli weryfikacji głównych założeń badawczych, praca poglądowa ma drugorzędowe znaczenie w zestawieniu z pracami oryginalnymi, jednak obecność jej przedruku w zestawieniu byłaby istotna.

Na wykonanie opisanych badań Doktorantka uzyskała zgodę Drugiej Warszawskiej Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach (WAW2/76/2017) zgodnej z regulacjami Dyrektywy 2010/63/EU, niestety, odpowiednia kserokopia nie została załączona do tekstu rozprawy.

We wstępie Doktorantka opisując elementy komórkowe mikrośrodowiska guza posługuje się sformulowaniem: „Komórki nieswoistego ... oraz swoistego układu immunologicznego ...”, co dla niewprawnego czytelnika może być mylące, ponieważ sugeruje obecność dwóch różnych układów odpornościowych. W tej sytuacji bardziej precyzyjnym byłoby określenie: komórki nieswoistej oraz swoistej odpowiedzi układu immunologicznego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została zaplanowana skrupulatnie i wykonana przy użyciu odpowiednich narzędzi badawczych. Pod względem edytorskim i estetycznym jest przygotowana bardzo starannie. Pomimo doskonałego stylu, dzięki któremu praca jest interesująca i zrozumiała, Autorka nie uniknęła błędów interpunkcyjnych i literowych, np. pojawia się sformułowanie „odporność wielolekowa”, a powinno być „oporność wielolekowa”, które jednak w żadnej mierze nie umniejszają wysokiej wartości naukowej dysertacji.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Aleksandry Filipiak-Duliban pt.: „Modele 3D jako alternatywne metody badań lekooporności nowotworów” ma oryginalny charakter, świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych i zasługuje na bardzo wysoką ocenę. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668)” W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie magister Aleksandry Filipiak-Duliban do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o odpowiednie wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Filipiak-Duliban.

Dr hab. n. med. Mariusz Kaczmarek, prof^W JMP