



**Katedra i Klinika Hematologii,
Transplantologii i Chorób
Wewnętrznych**
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: Prof. dr hab. med. Grzegorz W. Basak
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa
Tel.022-599-28-18; fax: 022-599-14-18; e-mail: hematologia@wum.edu.pl

Warszawa, dnia 12.02.2024

Prof. dr hab. med. Krzysztof Jamroziak
Klinika Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1A
02-097 Warszawa

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Balik pt.: „Mikrośrodowisko nowotworowe jako cel terapii personalizowanej”.

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Balik została oparta o wyniki badań wybranych mechanizmów interakcji pomiędzy mikrośrodowiskiem nowotworowym a komórkami guzów układu moczowo-płciowego oraz możliwości wykorzystania tych interakcji w terapii przeciwnowotworowej. Zgodnie z aktualnymi danymi epidemiologicznymi nowotwory stanowią obecnie drugą po chorobach układu sercowo-naczyniowego przyczynę przedwczesnej umieralności, a ich częstość gwałtownie wzrasta we wszystkich populacjach. Nowotwory układu moczowo-płciowego zaliczają się do najczęściej występujących chorób nowotworowych. Mikrośrodowisko nowotworowe to heterogeniczny układ wielu różnych populacji komórkowych oraz wydzielanych przez nich rozpuszczalnych mediatorów, które poprzez różnorodne interakcje mogą modyfikować zdolność do przeżycia i proliferacji komórek nowotworowych.

Przedstawiona do oceny praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich posiadających formę monografii. Liczy ogółem 107 stron i zawiera 117 pozycji piśmiennictwa, z których zdecydowana większość pochodzi z renomowanych czasopism zagranicznych i była opublikowana w ostatnich 10 latach. Praca napisana jest poprawnym stylistycznie językiem, a także dobrze przygotowana pod względem edytorskim. Tekst uzupełniony jest 4 dobrze

zaprojektowanymi tabelami oraz 36 rycinami. Zamieszczony w pracy wykaz skrótów ułatwia zrozumienie tekstu.

W pierwszej części liczącego 13 stron Wstępu Doktorantka omówiła dane epidemiologiczne dotyczące chorób nowotworowych oraz rolę mikrośrodowiska w onkogenezie. Następnie mgr Balik scharakteryzowała badane w pracy elementy mikrośrodowiska nowotworowego, w tym mezenchymalne komórki macierzyste i fibroblasty związane z rakiem, oraz omówiła wybrane wyniki badań, w których mikrośrodowisko było celem terapii. Na zakończenie przedstawiono zasadę badań w modelu „in vitro”. Wstęp jest klarownym wprowadzeniem do przedstawienia celu pracy.

Celem rozprawy doktorskiej mgr. Karoliny Balik była analiza wpływu rozpuszczalnych mediatorów syntetyzowanych przez fibroblasty związane z rakiem na skład sekretomu, przeżywalność, proliferację, apoptozę oraz wrażliwość na wybrane chemioterapeutyki komórek raka pęcherza moczowego i raka prostaty. Ponadto, Doktorantka postanowiła ocenić konsekwencje neutralizacji wybranych elementów mikrośrodowiska nowotworowego oraz wpływ cząsteczek wydzielanych przez mezenchymalne komórki macierzyste na lekooporność komórek tych nowotworów.

Do osiągnięcia założonego celu pracy mgr. Karolina Balik zastosowała właściwe metody badawcze. Zostały one opisane w liczącym 12 stron rozdziale „Materiały i metody”. Do badań wykorzystano linię raka prostaty DU145 oraz linię raka pęcherza moczowego HB-CLS-1. Medium kondycjonowane odpowiadające mikrośrodowisku nowotworowemu Doktorantka uzyskała z unieśmiertelnionych mezenchymalnych komórek macierzystych ACSStelo oraz pierwotnych fibroblastów związanych z rakiem prostaty HC-6223. Do badań lekowrażliwości komórek wybrano cisplatynę dla raka prostaty i ciprofloksacynę dla komórek raka pęcherza moczowego. Następnie, mgr Balik oceniła badane parametry przeżywalności i proliferacji i lekowrażliwości komórek nowotworowych za pomocą testów MTT, BrdU, barwienia CellEvast Caspase-3/7 Green oraz testów ELISA.

W obszernym, liczącym 40 strony rozdziale „Wyniki”, Doktorantka omawia rezultaty przeprowadzonych eksperymentów ilustrując je czytelnymi wykresami i tabelami. Rozdział składa się z trzech podrozdziałów. W pierwszym z nich szczegółowo przedstawiono wpływ mediatorów syntetyzowanych przez fibroblasty związane z rakiem na wybrane parametry komórek raka pęcherza moczowego i raka prostaty. W drugim podrozdziale Doktorantka omówiła wyniki oceny wpływu medium kondycjonowanego z fibroblastów związanych z rakiem na wybrane leki. W trzeciej części rozdziału przedstawiono wyniki oceny wpływu mezenchymalnych komórek macierzystych na komórki raka pęcherza moczowego i raka prostaty oraz ich lekowrażliwość.

W interesującej „Dyskusji” Doktorantka szczegółowo analizuje wyniki przeprowadzonych w pracy eksperymentów w szerokim kontekście rezultatów badań nad mikrośrodowiskiem nowotworowym opublikowanych przez innych badaczy. Wyjaśnia, że rozbieżne wyniki niektórych badań mogą wynikać z heterogenności mikrośrodowiska nowotworowego w różnych chorobach nowotworowych. Podkreśla również konieczność

dalszych badań w tym kierunku, które mogą doprowadzić do rozwoju innowacyjnych, personalizowanych terapii onkologicznych.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała następujące wnioski:

1. Fibroblasty związane z rakiem parakrynnie promują wzrost i proliferację komórek raka prostaty i raka pęcherza moczowego poprzez regulację ich sekretomu.
2. Mediatory syntetyzowane przez fibroblasty związane z rakiem obniżają wrażliwość komórek raka prostaty i raka pęcherza moczowego na stosowane chemioterapeutyki poprzez aktywację szlaków sygnalizacyjnych oraz regulowanie ekspresji białka p53.
3. Neutralizacja cząsteczek FGF z mikrośrodowiska guza wydaje się obiecującym kierunkiem badań nad strategią zwalczania lekooporności komórek raka prostaty i raka pęcherza moczowego.
4. Mezenchymalne komórki macierzyste parakrynnie promują wzrost i proliferację komórek raka prostaty i raka pęcherza moczowego, a także wpływają na oporność komórek nowotworowych na stosowane leki.

W mojej opinii najważniejszym osiągnięciem ocenianej pracy doktorskiej mgr Karoliny Balik jest dobrze zaplanowana i wykorzystująca różnorodne metody badawcze ocena roli fibroblastów związanych z nowotworem i mezenchymalnych komórek macierzystych w stymulowaniu proliferacji i lekooporności raka prostaty i raka pęcherza moczowego.

Po wnikliwej analizie rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Balik mam kilka uwag, które powinny być uwzględnione przed publikacją uzyskanych wyników:

1. Praca została dobrze zaplanowana z uwzględnieniem różnych metod badawczych interakcji obu typów komórek mikrośrodowiska nowotworu i komórek guzów. Jednak, biorąc pod uwagę ograniczenia sztucznego środowiska badań *in vitro* wydaje się, że zastosowanie w eksperymentach przynajmniej 2 różnych linii komórkowych dla każdego rodzaju nowotworu pozwoliłoby na lepsze udokumentowanie wniosków.
2. Pojawiający się wielokrotnie w pracy termin „fibroblasty związane z rakiem” nie wydaje się optymalnym tłumaczeniem angielskiej nazwy „cancer-associated fibroblasts”. Lepszy byłoby prawdopodobnie często stosowane określenie „fibroblasty związane z nowotworem” (np. w publikacji Dominiak A i wsp. Postepy Hig Med Dosw 2019; 73 : 536-549). Wynika to z faktu, że w piśmiennictwie angielskim słowo „cancer” najczęściej oznacza „nowotwór”, a nie „raka” w rozumieniu polskiej terminologii medycznej. Takie tłumaczenie jest o tyle uzasadnione, że te komórki mogą odgrywać podobną rolę również w nowotworach nienabłonkowych, np. mięsakiach lub chłoniakach, które nie są rakami według polskiego nazewnictwa.
3. Praca dotyczy badań *in vitro*, jedna ma potencjalne odległe konsekwencje kliniczne. Z tego względu w Dyskusji brakuje krótkiej analizy praktycznych możliwości zastosowania proponowanej strategii neutralizacji niektórych mediatorów np. FGF w mikrośrodowisku

nowotworu. W jaki sposób mogłoby to zostać przeprowadzone *in vivo* i z jakiego rodzaju toksycznością dla zdrowych tkanek należałoby się liczyć?

4. Rozprawa jest napisana poprawnym stylistycznie i naukowo językiem oraz dopracowana pod względem edytorskim. Doktorantka nie ustrzegła się jednak drobnych błędów w tym zakresie, które wymagają korekty, np.
- brak rozwinięcia anglojęzycznych skrótów w streszczeniu polskim
 - zbędne ilustrowanie graficzne wyników, w których nie obserwowano żadnych różnic statystycznych (ryc. 1,2, 22 i 32)
 - str. 33 - użycie terminu „odchylenie statystyczne” zamiast „odchylenie standardowe”

Powyższe uwagi nie mają wpływu na moją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Balik. Została ona napisana poprawnie pod względem językowym, a uzyskane wyniki i sformułowane wnioski zostały dobrze udokumentowane. Doktorantka zrealizowała założony cel pracy w oparciu o dobry warsztat naukowy, wykorzystując odpowiednie techniki badawcze oraz metody analizy statystycznej. Jestem przekonany, że praca doktorska mgr Karoliny Balik stanowi samodzielne rozwiązanie ważnego problemu naukowego. Praca ma szereg aspektów poznawczych oraz stanowi podstawę do dalszych badań, których wyniki mogą przyczynić się do poprawy terapii nowotworów układu moczowo-płciowego.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z późniejszymi zmianami. Mam zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy recenzję pracy i prosić Wysoką radę o dopuszczenie mgr Karoliny Balik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką jakość przeprowadzonych badań, znaczenie naukowe i potencjalne kliniczne uzyskanych wyników oraz doskonałe przygotowanie rozprawy doktorskiej wnioskuję o wyróżnienie pracy.

prof. dr hab. n. med.
KRZYSZTOF JAMROZIAK
hematolog
specjalista chorób wewnętrznych
1126364