

CENTRUM ONKOLOGII-INSTYTUT im. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE

ODDZIAŁ w KRAKOWIE

KLINIKA CHIRURGII ONKOLOGICZNEJ

Kierownik Oddziału Urologii

prof. dr hab. med. Andrzej Stelmach

tel. + 48 12 4229900

ul. Garncarska 11, 31-115 Kraków

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Mgr Dagmara Jaworska

Ocena wrażliwości komórek macierzystych CD44(+) CD(24(-) raka gruczołu krokowego na TRAIL – indukowaną apoptozę

Promotor: dr hab. n. med. Ewelina Szliszka

Recenzja

Przedstawiona do oceny praca doktorska jest analizą wrażliwości komórek macierzystych CD44(+) CD(24(-) raka gruczołu krokowego na TRAIL – indukowaną apoptozę. Jednocześnie stanowi próbę identyfikacji subpopulacji komórek raka stercza, które można uwrażliwić na apoptozę poprzez skojarzone zastosowanie ligandu czynnika martwicy nowotworu indukującego apoptozę i taksanów.

Rozprawa obejmuje łącznie 64 strony i ma typowy układ z podziałem na wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski i piśmiennictwo. Praca zawiera listę skrótów i wykaz rycin i tabel, a w części końcowej załączniki. Nowością rozprawy doktorskiej jest załączenie przez Autorkę dwóch publikacji w International Journal of Molecular Sciences z lat 2015 i 2017, których jest pierwszym autorem. Pierwsza publikacja jest poświęcona postępom w badaniach nad komórkami macierzystymi raka stercza. W pracy Autorka podkreśla rolę heterogeniczności linii komórek raka, co może być przyczyną inicjacji i progresji nowotworu do postaci inwazyjnej i powstania przerzutów. Eradykacja komórek macierzystych raka stercza może być obiecującym celem w jego leczeniu, oraz poprawić rokowanie u chorych z zaawansowaną chorobą.

Kolejna praca poświęcona jest aktywacji celowanej apoptozy przeciw komórkom macierzystym raka gruczołu krokowego. We wnioskach Autorka wykazuje, że zastosowanie taksanów może zwiększyć apoptozę wywołaną przez ligand czynnika martwicy nowotworu indukujący apoptozę. Rozprawa doktorska jest więc kontynuacją badań Autorki nad podatnością komórek macierzystych raka gruczołu krokowego na TRAIL-indukowaną apoptozę.

We wprowadzeniu Doktorantka omawia hipotezy tłumaczące powstanie, rozwój i progresję raka gruczołu krokowego, skupiając się na nowotworowych komórkach macierzystych.

Kolejne rozdziały zawierają: określenie celów badawczych, przedstawienie materiałów i zastosowanych metod badawczych, analizę statystyczną, prezentację uzyskanych wyników oraz ich szczegółowe omówienie, dyskusję, a także określenie wniosków końcowych. Streszczenie zawarto na ostatnich stronach dysertacji.

Sposób przygotowania pracy nie budzi zastrzeżeń pod względem stylu i nomenklatury. Uzyskane wyniki są przedstawione bardzo wyczerpująco w tekście, a ich interpretację ułatwiają starannie przygotowane tabele i ryciny zawarte w załączonych publikacjach. Piśmiennictwo zawarte tamże to 201 pozycji anglojęzycznych z ostatniej dekady. Świadczy to o tym, że Doktorantka podjęła się badań nad zupełnie nową tematyką praktycznie nieobecną w polskim piśmiennictwie. Dobór i sposób cytowania świadczą o znajomości przedmiotu rozprawy.

Wybrany temat jest naukowo uzasadniony i stanowi ważne zagadnienie w praktyce klinicznej. Po pierwsze, rak stercza należy do grupy złośliwych nowotworów o rosnącej zachorowalności i nadal wysokiej śmiertelności, zwłaszcza w wyższych stopniach zaawansowania TNM. Po drugie, mimo coraz szerzej prowadzonej profilaktyki onkologicznej, wzrostu świadomości zdrowotnej społeczeństwa i powszechniej stosowanych badań lekarskich, nadal znaczny odsetek stanowią chorzy w wyższych, już nieoperacyjnych, lub niewyleczalnych stopniach zaawansowania nowotworu, co ma udowodnione implikacje kliniczne w zakresie czasu przeżycia, jak i jakości życia. Poszukiwanie nowych czynników predykcyjnych, może poprawić skuteczność leczenia w mniej zaawansowanych stadiach choroby, a także poprawić rokowanie w stadiach zaawansowanych. Stanowi to główny cel tej rozprawy doktorskiej i jest poszukiwaniem odpowiedzi na celowość takiej terapii i związane z tym ryzyko

postępu choroby. Ponadto badania *in vitro* dotyczące wrażliwości subpopulacji komórek raka stercza na taksany przeniesione do badań klinicznych mogą pozwolić na wyodrębnienie podgrup chorych, którzy odniosą wymierny efekt kliniczny takiego postępowania.

W części wstępnej Autorka przedstawia metody identyfikacji komórek macierzystych na podstawie szeregu wymienionych markerów. Omawia mechanizm działania cytostatyków na komórki raka gruczołu krokowego, oraz rolę ligandu TRAIL jako naturalnego endogennego aktywatora procesu apoptozy w komórkach nowotworowych.

Cel pracy został jasno sformułowany. Cele badawcze postawione przez Doktorantkę można podzielić na dwie grupy. Do pierwszej grupy należy ocena występowania komórek macierzystych raka o fenotypie CD44(+) CD24(-) w populacji komórek raka stercza i określenie ich wrażliwości na działanie TRAIL i cytostatyków. Druga grupa to próba identyfikacji ekspresji receptorów dla TRAIL na komórkach macierzystych i ocena nasilenia apoptozy indukowanej TRAIL przez badane taksany, co jest ważnym elementem i walorem tej publikacji.

Na kolejnych stronach przedstawiono materiały użyte do badania – komórki raka gruczołu krokowego, ludzki rekombinowany TRAIL i cytostatyki – paklitaksel, docetaksel i kabazytaksel. Wykorzystane w pracy metody to ocena apoptozy metodą cytometrii przepływowej, pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej, ocena liczebności komórek macierzystych raka o fenotypie CD44(+) CD24(-) metodą cytometrii przepływowej, ocena apoptozy subpopulacji komórek macierzystych raka o fenotypie CD44(+) CD24(-) metodą cytometrii przepływowej i ocena ekspresji receptorów TRAIL-R1,-R2,-R3, -R4 metodą cytometrii przepływowej.

Analizę statystyczną wykonano przy użyciu arkusza kalkulacyjnego Excel 2010 firmy Microsoft i pakietu Statistica w wersji 12.0 firmy Statsoft. Do oceny oddziaływania czynników na badaną cechę wynikową zastosowano test t-Studenta lub test ANOVA, poprzedzone testem Bartletta sprawdzającym jednorodność wariancji. Dla wszystkich testów za istotną statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$.

W opinii recenzenta takie podejście badawcze podnosi wartość pracy. Godne podkreślenia jest również założenie prowadzenia analizy w sześciu powtórzeniach co przedstawiono w postaci średniej i odchyleniu standardowym. W ocenie metodyki

należy również z uznaniem odnieść się do starannego omówienia metod statystycznych zastosowanych w sposób przemyślany i odpowiedni w stosunku do założonych celów badawczych.

Duże uznanie budzi sposób przedstawienia wyników. Doktorantka bardzo szczegółowo, ale jednocześnie czytelnie przedstawia swoje obserwacje i wyniki analizy poszczególnych zależności w podsumowaniu wyników. Na kolejnych 4 stronach przedstawia uzyskane wyniki uwzględniając kolejno zastosowane metody badawcze, ich analizę statystyczną i interpretację wyników.

Dyskusja i omówienie uzyskanych wyników oparte są na analizie właściwie dobranego piśmiennictwa i uwzględniają założenia badawcze oraz wszystkie uzyskane obserwacje. Sposób omówienia wymienionych zagadnień świadczy o gruntownej wiedzy Doktoranta w zakresie tematyki pracy. W rozdziale tym omówiono rolę komórek macierzystych raka, ich potencjał przerzutowania. Przedstawiono metody leczenia raka gruczołu krokowego, poświęcając więcej miejscach mechanizmowi działania cytostatyków. Szeroko opisano rolę TRAIL w indukowanej apoptozie. Uzyskane wyniki wykazały, że komórki TRAIL-opornych dwóch linii komórek raka gruczołu krokowego mogą zostać uwrażliwione na TRAIL-indukowaną śmierć komórki przez synergistyczny efekt cytostatyczny. Analiza apoptozy metodą cytometrii przepływowej potwierdziła większą oporność komórek macierzystych raka o fenotypie CD44(+) CD24(-) na działanie TRAIL i cytostatyków, jednak równoczesne zastosowanie obydwu czynników powodowało spadek subpopulacji komórek CSCs. Jedynie w komórkach linii DU145 nie udało się przełamać TRAIL-oporności. TRAIL okazuje się obiecującym lekiem w terapii przeciwnowotworowej, a połączenie z taksanami uwrażliwia komórki CSCs na proces apoptozy. W XXI wieku jest to nowy obszar wyzwań w onkologii mogący poprawić wyniki leczenia chorych na raka stercza zwłaszcza w stadium zaawansowanym. Powyższe wyniki zostały zawarte w 5 wnioskach, które odpowiadają na założone cele pracy.

Uzyskane wyniki wzbogacają wiedzę na temat prognozowania i przewidywania skutków leczenia. Przedstawione wnioski oparte o badania *in vitro* po wprowadzeniu do praktyki klinicznej powinny mieć istotną wartość praktyczną.

Ogólna ocena pracy jest wysoka, co wynika z prawidłowości przeprowadzonych badań oraz znaczenia uzyskanych wyników. Projekt badania, zastosowana metodyka


badawcza, analiza uzyskanych wyników i ich interpretacja, a także sposób wykorzystania piśmiennictwa w przygotowaniu pracy oraz omówieniu jej wyników świadczą o wysokim poziomie wiedzy teoretycznej oraz doświadczeniu klinicznym Autora. Przedstawione wnioski są zgodne z postawionymi celami badawczymi i mają uzasadnienie w osiągniętych wynikach. Wyniki pracy Doktorantki mają znaczenie dla optymalizacji postępowania terapeutycznego prowadzonego u chorych na raka stercza w stadium zaawansowanym, gdzie integralną częścią terapii jest leczenie systemowe.

W ocenie recenzenta, Autorka podjęła się trudnego zadania, z którego jako badacz wywiązała się dobrze. Niezależnie od tematu pracy i uzyskanych wyników jej dodatkowymi walorami jest poszukiwanie subpopulacji chorych do terapii celowanych w oparciu o poznanie czynników predykcyjnych.

Rozprawa doktorska zatytułowana „Ocena wrażliwości komórek macierzystych CD44(+) CD(24(-) raka gruczołu krokowego na TRAIL – indukowaną apoptozę” spełnia wymagania określone w artykule 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr65,poz.595, z późn. zm.).

Zwracam się do Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o dopuszczenie magister Dagmary Jaworskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 16 maja 2018 roku


Prof. dr hab. med. Andrzej W. Szelmech
specjalista chirurgii ogólnej
specjalista chirurgii onkologicznej
specjalista urologii / ZBU
8478036 980610685