



dr hab. Antonina Mazur
antonina.mazur@uwr.edu.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Jarosz

pt.: „Charakterystyka syngenicznych modeli przerzutującego mysiego raka prostaty TRAMP-C1 i TRAMP-C2 ze szczególnym uwzględnieniem roli układu odpornościowego i IL-33.”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Jarosz została wykonana pod opieką promotorską prof. dr hab. Joanny Wietrzyk, w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Rak prostaty jest jednym z najczęstszych nowotworów dotyczących mężczyzn na Świecie. Wśród nowych przypadków nowotworów zdiagnozowanych w 2019r. u mężczyzn w Polsce rak prostaty był na pierwszym miejscu. W związku z tym, gruntowne poznanie mechanizmów prowadzących do progresji tego nowotworu jest konieczne, co w dalszej perspektywie pozwoliłoby na opracowanie skuteczniejszych niż obecne schematów diagnostycznych oraz terapeutycznych. W badaniach nad przyczyną nowotworzenia oraz czynnikami przyspieszającymi bądź zwalniającymi progresję nowotworu potrzebujemy dobrych modeli komórkowych oraz zwierzęcych. Stąd też właściwym było przeprowadzenie badań opisanych w ocenianej rozprawie doktorskiej. Badania te dotyczyły ustalenia, czy są różnice pomiędzy dwoma modelami mysiego raka prostaty – TRAMP-C1 i TRAMP-C2 - w kontekście ich potencjału do tworzenia guzów w warunkach *in vivo* oraz zdolności do migracji i adhezji w warunkach *in vitro*.

Rozprawa doktorska, obejmująca 144 strony, ma typowy układ dla tego typu prac. Jest ona podzielona na następujące rozdziały: wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski oraz bibliografia. W pracy znajdują się ponadto streszczenia w języku polskim oraz angielskim, spis rycin i tabel, wykaz skrótów, a także suplement.

Streszczenia w języku polskim oraz angielskim zostały prawidłowo zredagowane i zawierają wszystkie najważniejsze elementy rozprawy. Chociaż brakuje tutaj akapitu podsumowującego uzyskane wyniki.

We wstępie Doktorantka bardzo wyczerpująco porusza kwestie dotyczące raka prostaty oraz interleukiny 33 (IL-33). Ten rozdział jest bardzo dobrze napisany. Doktorantka przeanalizowała imponującą liczbę artykułów naukowych i starała się, jak najpełniej opisać, m.in. wpływ poszczególnych populacji komórek układu immunologicznego na powstawanie oraz progresję raka prostaty, a także rolę IL-33 w ww. procesach. W tej części pracy Doktorantka pochyla się także nad myślimi modelami wykorzystywanymi w badaniach nad rakiem prostaty i konstatuje, że brakuje wieloaspektowego porównania linii komórkowych TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. Mam tutaj jednak pewne zastrzeżenia. W tekście nie ma odniesienia do ryciny 1.2A. Czy Doktorantka mogłaby się odnieść do następującego zdania ze strony 18: „W rodzinach około 20% pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem prostaty występował ten typ nowotworu” w celu wytłumaczenia, co miała tutaj na myśli? Chciałabym także prosić o wytłumaczenie kwestii wariantu chromosomu 8q24 w odniesieniu do zwiększonego ryzyka raka prostaty (str. 19). Czy Doktorantka mogłaby opisać, w jaki sposób zostały uzyskane myszy TRAMP? Dużo miejsca poświęć IL-33 z uwzględnieniem jej różnej lokalizacji w komórce i poza nią. Czy Doktorantka mogłaby odpowiedzieć na pytanie, czy wydzielana IL-33 dostaje się do komórki, a jeżeli tak, to dzięki jakiemu mechanizmowi?

W kolejnym rozdziale pracy Autorka jasno nakreśla, jakie założenia i cel przyświecały jej pracy. Podkreśla zasadność używania modeli zwierzęcych w badaniach nad nowotworami oraz konieczność pogłębionej charakterystyki porównawczej wybranych modeli TRAMP-C1 i TRAMP-C2. Cele mogły zostać jednak bardziej szczegółowo przedstawione np. w postaci punktów.

W rozdziale „Materiały i metody” poprawnie opisano wszystkie procedury, jakie posłużyły do uzyskania wyników. Niestety brakuje w tej części pracy rozdziału poświęconego analizie statystycznej uzyskanych wyników. Jest to spore uchybienie, szczególnie, że nie wszystkie opisy figur, zamieszczonych w wynikach, zawierają odpowiednie informacje. Nie wiadomo, dlaczego do analizy uzyskanych rezultatów wybierano różne testy statystyczne oraz jakiego programu użyto do ich przeprowadzenia. Brakuje także numerów katalogowych dla najważniejszych odczynników. Szczególnie są to istotne dane w odniesieniu do użytych pierwszorzędowych przeciwciał, które w przypadku techniki *Western blotting* są królicze. Czy Autorka mogłaby odnieść się do kwestii specyficzności tych przeciwciał? Nie wiadomo także, który rodzaj matryzeli został użyty w badaniach. Przy stężeniach wyrażonych w procentach brakuje informacji, czy są to % w/o, o/o czy też w/w. Nie przy każdej procedurze tzw. prędkość wirowania jest wyrażona w $x g$ (str. 46, 65 i 69). Często możemy znaleźć informację o stosowaniu probówek typu Eppendorf, jednakże nie ma informacji o ich objętościach. Nie został podany skład buforu RIPA (str. 53 i 65), natomiast skład buforu TSM jest podany dwukrotnie (str. 45 i 68). Czy Doktorantka mogłaby udzielić informacji, czy komórki podawane ortotopowo były aplikowane każdorazowo do tego samego płata prostaty, a jeżeli tak, to do którego i czym było to podyktowane? Brakuje informacji na temat sprzętu użytego do analizy PCR w czasie rzeczywistym (str. 60-63). W tabelach 3.4, 3.6 oraz 3.8 nie zostały odpowiednio wymienione przeciwciała rozpoznające FOXP3, zestaw ELISA na CCL12 oraz przeciwciała skierowane przeciwko β aktynie.

W części „Wyniki” Autorka przedstawia rezultaty swoich badań. Na uznanie zasługuje fakt, że w swoich eksperymentach wykorzystwała bardzo szeroką paletę metod i technik, co dowodzi

posiadania bogatego warsztatu metodologicznego. Tę część pracy czyta się dobrze, a jej układ jest logiczny. Na początku zostały omówione wyniki pokazujące skalę formowania guzów po podaniu komórek TRAMP-C1 lub TRAMP-C2 dwoma różnymi sposobami: ortotopowo do jednego z płatów prostaty lub dożylnie. Już po analizie tych wyników można odnieść wrażenie, że komórki TRAMP-C2 mają większą tendencję do tworzenia guzów i przerzutów niż komórki TRAMP-C1. Ciekawe wyniki udało się uzyskać dzięki zastosowaniu macierzy cytokinowych. Wydaje się, że poza IL-33 w przyszłości będzie można wybrać do badań także inne cząsteczki, których poziomy zdają się różnić pomiędzy badanymi liniami komórkowymi, np. serpinę 1 czy też łańcuch alfa kolagenu typu XVIII. Poza badaniami przeprowadzonymi *in vivo*, część wyników dotyczy porównania wybranych właściwości obu testowanych linii TRAMP w warunkach *in vitro*. Pokazano m.in., że linia C2 charakteryzuje się większą wrażliwością na 5-fluorouracyl niż linia C1. Ponadto, przy pomocy analizy *Western blotting*, oszacowano poziomy wybranych białek zaangażowanych w adhezję komórek oraz ustalono wpływ dwóch stężeń IL-33 na migrację i adhezję badanych komórek. W tym miejscu chciałabym prosić Doktorantkę o ustosunkowanie się do kilku kwestii, które zostały wypunktowane poniżej.

1. W przypadku dożylnego podawania myszom komórek TRAMP pokazano wyniki z formowania guzów tylko dla płuc. Czy inne organy, w tym prostata, nie były analizowane? Czy płuca są głównym celem dla odległych przerzutów w przypadku raka prostaty?
2. Na rycinach 4.10 oraz 4.11 pokazane są wykresy kropkowe nie tylko dla Lys6C, ale także dla Lys6G, natomiast nie ma pokazanych wykresów słupkowych dla tego białka, ta kwestia nie jest też poruszana w samym tekście.
3. Interesujące wyniki pokazano w podrozdziale 4.1.10, na podstawie których można stwierdzić, że w 54 dniu od ortotopowego podania komórek TRAMP, szczególnie dla komórek C2, poziomy alaniny, waliny, fenyloalaniny, tyrozyny, leucyny oraz metioniny były znacznie obniżone w porównaniu do kontroli typu SHAM. Czy można się dowiedzieć, jakie rezultaty uzyskano dla pozostałych analizowanych aminokwasów? Ich poziom nie uległ zmianie? Jest to intrygujące, ponieważ w dyskusji na str. 105 Autorka powołuje się na pracę, w której pokazano, że analiza sześciu aminokwasów – metioniny, etanoloaminy, glutaminy, izoleucyny, argininy i leucyny - może mieć prognostyczne znaczenie w raku prostaty.
4. Czy można poprosić o wytłumaczenie, dlaczego postanowiono sprawdzić poziom endoteliny 1?
5. Do testów migracji oraz adhezji użyto dwóch wybranych białek macierzy pozakomórkowej, tj. fibronektyny oraz kolagenu typu IV. Dlaczego spośród wielu białek strukturalnych ECM akurat te dwa białka macierzy pozakomórkowej zostały wybrane do badań? Jakim kluczem kierowano się przy wyborze zastosowanych stężeń ww. białek?
6. Intryguje mnie fakt użycia wysokiego stężenia IL-33 o wartości równej 1 ng/ml w badaniach *in vitro*. Stężenie tej interleukiny w guzie raka prostaty wynosi 0,1-0,3 ng/ml. Czy Doktorantka mogłaby uzasadnić wybór tego wyższego stężenia do swoich badań? Czy

można także prosić o próbę wytlumaczenia, dlaczego wyniki uzyskane dla wyższego stężenia IL-33 są takie zaskakujące?

Muszę teraz powrócić do kwestii analizy statystycznej. Jak już napisałam powyżej, w odpowiednim rozdziale nie ma części opisującej, w jaki sposób analiza statystyczna została przeprowadzona. W związku z tym, trudno jest ocenić, czy wyniki zostały właściwie opracowane, a co za tym idzie zinterpretowane. W legendach do następujących rycin: 4.2, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 nie ma nic o teście statystycznym, mimo że istotność statystyczna jest zaznaczona na rycinach. Czy, skoro Autorka stwierdza, że wzrost masy zwierząt obarczonych nowotworem był wolniejszy w stosunku do zwierząt kontrolnych, a średnia objętość guzów w grupie TRAMP-C2 była dwukrotnie wyższa w stosunku do grupy TRAMP-C1 w 72 dniu eksperymentu (str. 70), to była przeprowadzona jakaś analiza statystyczna? Nie ma na ten temat informacji w opisie ryciny 4.1 (A-C), a analizując te wykresy, wydaje się, że taka analiza powinna być zostać przeprowadzona. Ponadto nie jest wiadomo, jakim kluczem kierowała się Doktorantka, pokazując tylko na niektórych wykresach wartość *p*. W opisie każdej ryciny tam, gdzie są pokazane dane w formie wykresów z zaznaczonym odchyleniem standardowym powinna być podana liczba obserwacji / punktów (*n*). Wyżej wymienione uchybienia powodują, że Doktorantka czasami nadinterpretuje uzyskane wyniki, jak ma to miejsce, np., w dyskusji na stronie 98, gdzie stwierdza, że komórki TRAMP-C2 są mniej wrażliwe niż komórki TRAMP-C1 na paklitaxel, docetaxel oraz cisplatynę, podczas gdy analiza statystyczna tego nie pokazuje.

Inną istotną kwestią jest dobór kontroli dla eksperymentów *in vivo*, w których komórki były podawane zwierzętom ortotopowo. W części eksperymentów stosowano dwie kontrole, czyli zwierzęta zdrowe oraz poddane pozorowanej operacji (SHAM), podczas której podawano do płata prostaty mieszaninę płynu Hanksa oraz matryzolu. W innych eksperymentach jako kontrolę stosowano albo kontrolę typu SHAM (podrozdziały 4.1.4, 4.1.5, 4.1.6, 4.1.7, 4.1.10), albo zdrowe zwierzęta (4.1.11, 4.1.12, 4.1.13). Dlaczego w badaniach przy użyciu macierzy cytokinowych w przypadku osocza (podrozdział 4.1.8.1) badano grupy SHAM, TRAMP-C1 i TRAMP-C2, a w przypadku lizatów z guzów analizowano tylko grupy TRAMP-C1 i TRAMP-C2 (podrozdział 4.1.8.2)? Dlaczego nie uwzględniono tutaj materiału z prostat pobranych od zwierząt z grupy SHAM? Porównanie produkcji cytokin pomiędzy guzami a zdrowymi prostatami mogłoby dać ciekawe rezultaty. W przypadku analizy poziomu ekspresji genów związanych z procesem inwazji i przerzutowania (podrozdział 4.1.9) porównywano pomiędzy sobą guzy TRAMP-C1 i TRAMP-C2, nie uwzględniając materiału pobranego ze zdrowej prostaty (kontrola typu SHAM). Notabene po podrozdziale 4.1.2 można było napisać, że dalsze analizy *in vivo* były prowadzone już tylko dla warunku, gdy komórki TRAMP były podawane ortotopowo. Poza kwestiami formalno-edytorskimi, które omawiam poniżej, nie mam innych zastrzeżeń do tej części pracy.

W dyskusji Autorka rozprawy krytycznie odnosi się do uzyskanych wyników i porównuje je z rezultatami opisanymi w dostępnej literaturze. Ten rozdział mógł zostać jednakże bardziej syntetycznie napisany, gdyż sporą część tekstu stanowi ponowny opis uzyskanych wyników. Nie rozumiem, dlaczego na początku dyskusji Autorka odnosi się do części rezultatów, które w poprzedniej partii pracy były opisane jako jedne z ostatnich, po czym przechodzi do dyskusowania wyników, które w rozdziale „Wyniki” były omawiane jako jedne z pierwszych.

Bardzo dobrym pomysłem było syntetyczne sformułowanie sześciu wniosków, które zostały zamieszczone po dyskusji. Jest to szczególnie ważne, iż opisane w ocenianej rozprawie wyniki są niejednoznaczne i jest ich sporo. Wnioski porządkują je. Wydaje się, że najważniejszą konstatacją jest stwierdzenie, że oba modele raka prostaty w układzie syngenicznym mogą być stosowane do badania roli układu immunologicznego w powstawaniu oraz progresji raka prostaty, a także wpływu procesu nowotworzenia na zmiany w metabolizmie na poziomie organizmu.

W tej części recenzji powinnam przejść do omówienia pracy pod kątem formalno-edytorskim. Jednak ten akapit będzie na pograniczu oceny pracy pod ww. kątem i jej analizy od strony merytorycznej. Razi niestety nagminne używanie w całej pracy określeń: „ekspresja” i „nadekspresja”, zamiast których powinny być odpowiednio użyte sformułowania: „poziom” / „obecność” oraz „zwiększony poziom” bądź „nadprodukcja”. Doktorantka błędnie używa wyrażen „ekspresja” i „nadekspresja”, mając na myśli białko. Jest to kalka z języka angielskiego. Sformułowania „ekspresja” i „nadekspresja” odnoszą się do genu. Takie mylne używanie ww. sformułowań prowadzi do błędów wyrażonych, np., w następującym zdaniu: „[...] gen HOXB13, którego mutacja G84E jest często spotykana w rodzinach, [...]” (str. 19) lub (na tej samej stronie): „chromosom X, który zawiera receptor androgenowy,” albo „knock-out IL-33” (str. 39).

Przechodząc już do oceny rozprawy pod kątem formalno-edytorskim, należy zwrócić uwagę na fakt, że praca została napisana poprawnie pod kątem językowym. Zdarzają się jednak kolokwializmy [np. „komórki ściągano” (str. 67) czy też „komórki zdjęto” (str. 46)]. W rozprawie jest także sporo literówek, drobnych błędów gramatycznych, stylistycznych oraz bardzo wiele uchybień interpunkcyjnych, szczególnie mam tu na myśli konstrukcję: „zarówno ..., jak i ...” oraz kwestię imiesłowów przysłówkowych. W rozdziale „Materiały i metody” przeszkadza naprzemiennie używanie czasów przeszłych dokonanego i niedokonanego. Spośród innych niedociągnięć należy wymienić także sposób zapisu liczby atomów danego pierwiastka we wzorach sumarycznych związków chemicznych (w części „Materiały i metody”), które powinny być zapisane w formie dolnego indeksu, a nie są. Część skrótów nie została wytłumaczona, np. APS, CD, DEPC, EDTA, FCS, IL, PVDF, RIPA czy też TEMED. Część skrótów, mimo że często pojawiają się w tekście (np. TME), nie została uwzględniona w odpowiednim spisie. Dodatkowo w tekście pojawia się sporo wyrażen pisanych w wersji angielskiej, np., „knock-out”, „dot plot”, „matrigel”, „Trypan blue”, „heat map”, „real-time”, a nawet „water”; a przecież są polskie odpowiedniki tych wyrażen / słów. Spośród innych niedociągnięć należy wymienić: brak umieszczenia informacji o bibliografii w spisie treści; stosowanie słowa „zewnątrzkomórkowa” w odniesieniu do przestrzeni czy macierzy; skrót w/w nie rozwija się do wyżej wymieniony, tu poprawnym zapisem jest ww.; stosowanie zamiast zapisu *Western blotting* wyrażenia „Western blot”; naprzemiennie używanie nazw ST2 i ST-2 (powinno to być ujednolicone); nie zawsze właściwe używanie słów ilość oraz liczba bez zwracania uwagi, czy rzeczownik jest policzalny czy też nie (np. „ilość zgonów” na str. 16). Jako ostatnią uwagę wymienię tutaj brak odniesienia się do tabel 0.1, 0.2 oraz 0.3 w rozdziałach „Materiały i metody” oraz „Wyniki.”

Autorka wymienia 287 pozycji w części „Bibliografia”. Spośród nich jedynie 2 pozycje to odnośniki internetowe z podaną każdorazowo datą dostępu. Poza nimi znakomita większość pozycji

pochodzi z ostatnich 10 lat, co zasługuje na uznanie. Pozycje literaturowe zostały prawidłowo dobrane, co świadczy o wyśmienitym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki.

Wymienione błędy oraz uchybienia musiały zostać wyrażone w niniejszej recenzji, gdyż taki jest obowiązek Recenzenta. Jednakże ww. niedociągnięcia nie wpływają bardzo znacząco na merytoryczną wartość pracy, która jest wysoka. Można założyć, że przynajmniej część opisanych wyników zostanie opublikowana w formie artykułu w czasopiśmie z listy JCR.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2018 poz. 1668).

Reasumując, przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr inż. Joanny Jarosz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Antoine Ulmer.