

Kraków, 23 września 2022

JAGIELLONIAN  
UNIVERSITY  
IN KRAKOW

**Ocena 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”**

Faculty of Biochemistry,  
Biophysics and  
Biotechnology

Department of Cell  
Biology

Prof. Jarosław Czyż

Nowotwory stanowią jeden z najpoważniejszych problemów współczesnej medycyny, a ich negatywny wpływ na dobrostan społeczeństw rośnie z każdą dekadą. Jest to związane zarówno z postępującą „antropogenizacją” środowiska człowieka, jak i z rozwojem cywilizacyjnym i związanym z tym wzrostem średniej długości życia. Nowotwory prostaty są być może najlepszym przykładem choroby, której incydencja powiązana jest z postępującym starzeniem się społeczeństw, gdyż przede wszystkim dotyczą one mężczyzn w podeszłym wieku. Mimo stałego postępu wiedzy na temat przebiegu tej choroby, czynników ryzyka z nią związanych i rozwoju strategii profilaktyki i jej leczenia, rak prostaty to jeden z najczęściej występujących nowotworów i jedna z najczęstszych przyczyn śmierci wśród pacjentów nowotworowych. Z tego względu konieczna jest dalsza intensyfikacja badań nad genezą i leczeniem raka prostaty, a do tego konieczne są modele doświadczalne w sposób maksymalnie wierny odtwarzające przebieg, w tym progresję tego nowotworu. Wśród nich wyróżnia się syngeniczny model oparty o szczep myszy TRAMP, które wykazują predylekcję do rozwoju nowotworów prostaty. Pozwala on m.in. na badania interakcji między nowotworem a systemem odpornościowym gospodarza, co jest mocno utrudnione lub niemożliwe w przypadku modeli opartych o zwierzęta z deficytami immunologicznymi (np. SCID). Jednak model ten pozostaje wciąż nie do końca wystandaryzowany. Podstawowym celem pracy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Jarosz była analiza porównawcza syngenicznych mysich modeli raka prostaty opartych o linie komórek TRAMP-C1 i TRAMP-C2. W szczególności skoncentrowała się ona na odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Dlatego zaproponowana tematyka wpisuje się w aktualne trendy badawcze, gdyż obejmuje zarówno aspekty podstawowe, jak i kwestie potencjalnie kluczowe dla rozwoju immunoonkologii raka prostaty.

ul. Gronostajowa 7  
30-387 Kraków  
tel. +48(12) 664 6146  
fax +48(12) 664 69 02  
e-mail: jarek.czyz@uj.edu.pl

Na poziomie redakcyjnym praca ma rozkład typowy dla tego typu opracowań. Składa się z dobrze skompilowanych Streszczeń w języku polskim i angielskim, tabeli skrótów, Wstępu, Celów Pracy, opisu Metod i Wyników, oraz ich Dyskusji, Literatury i Suplementu. Praca liczy 144 strony i zawiera 29 rycin oraz kilkanaście tabel, a bibliografia liczy 287 pozycji. Strona redakcyjna rozprawy nie wzbudza większych zastrzeżeń: liczba błędów literowych, stylistycznych i niezręcznych sformułowań, które zauważyłem (np. „stężenie komórek”), mieści się w zakresie wartości ogólnie przyjętych za usprawiedliwione okolicznościami i nie wpływa na jednoznacznie pozytywny odbiór całości rozprawy.

Tło tematyczne badań prowadzonych w ramach rozprawy zostało zarysowane w 25-stronnicowym Wstępie. Autorka wprowadza w nim czytelnika w podstawowe zagadnienia dotyczące znaczenia raka prostaty, metod jego badania i niektórych procesów leżących u podstaw jego rozwoju, w szczególności aktywacji układu odpornościowego gospodarza. W pierwszej

części Autorka opisała znaczenie cywilizacyjne raka prostaty i na jego tle nawiązała do obiektu badań przedstawionych w rozprawie. Następnie skoncentrowała się ona na etapach jego rozwoju, płynnie przechodząc do zagadnień związanych ze znaczeniem stanu zapalnego i poszczególnych subpopulacji układu odpornościowego w tym procesie. Wreszcie przeszła do omówienia narzędzi badawczych, w tym modeli *in vivo*, służących w badaniach nad mechanizmami promocji i progresji raka prostaty. W szczególności omówiła ona model syngeniczny i ortotopowy, ich wady i zalety, koncentrując się na modelu TRAMP, wykorzystanym w badaniach będących podstawą rozprawy. Ta część Wstępu koncentruje się też na zastosowaniu tego podejścia w badaniach interakcji między nowotworem a układem odpornościowym gospodarza. W ostatniej części rozdziału Autorka zajęła się IL-33 i jej bardzo złożoną, jak się okazuje, funkcją w rozwoju nowotworów.

Mimo złożoności nakreślonych we Wstępie problemów, tę część rozprawy czyta się dobrze, co wynika z łatwego w percepcji i ilustratywnego języka rozprawy. Niemniej brakuje tutaj diagramów ilustrujących funkcje poszczególnych sub-populacji komórek układu odpornościowego i powiązań między nimi w toku promocji i progresji nowotworów. Na przykład diagram przedstawiający możliwe sieci zależności między poszczególnymi funkcjami IL-33, w kontekście jej powiązań z poszczególnymi sub-populacjami komórek układu odpornościowego pomógłby w zrozumieniu tej skomplikowanej materii. Wskazany byłby również krótki akapit nawiązujący do cech komórek nowotworowych decydujących o ich inwazyjności i potencjale metastatycznym. Jednak mimo tych niedociągnięć rozdział ten skonstruowany jest w sposób logiczny, zawiera duży ładunek merytoryczny, a także dobrze wprowadza czytelnika w tematykę pracy.

Cele wykonanych w ramach rozprawy badań zostały przedstawione w sposób klarowny, choć brakuje w nich jasno postawionej hipotezy badawczej. Można to tłumaczyć częściowo fenomenologicznym charakterem projektu. Wedle Autorki najważniejszym celem rozprawy było doprecyzowanie mechanizmów decydujących o tempie rozwoju i przerzutowania syngenicznych guzów prostaty tworzonych przez dwie linie komórkowe (TRAMP-C1 i TRAMP-C2) z wykorzystaniem modelu doświadczalnego opartego przede wszystkim o ortotopowy model raka prostaty *in vivo*. W szczególności Autorka skoncentrowała się na interakcjach guzów z układem odpornościowym gospodarza, tj. na jego odpowiedzi immunologicznej na rozwój obu typów nowotworów oraz na mediatorach tej odpowiedzi.

Metodyka to bardzo mocna strona rozprawy. Na uwagę zasługuje skojarzenie w jednej pracy technik *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro*. Wśród tych pierwszych wyróżnić można, oprócz wzmiankowanego wyżej modelu ortotopowego, podejście oparte o dożylnie podawanie komórek raka prostaty i analizy ultrasonograficzne i histopatologiczne na poziomie systemicznym i tkankowym. Wśród technik *ex vivo* Autorka wykorzystwała m.in. testy ELISA, macierze cytokinowe i PCR, analizy profilu aminokwasowego i morfologii krwi. Zostały one uzupełnione technikami *in vitro*, w tym testami (trans)migracji, adhezji i żywotności komórek w obecności IL-33. Użycie urozmaiconych i wzajemnie komplementarnych metod bardzo dobrze świadczy o warsztacie badawczym Autorki rozprawy. Trudno mieć zastrzeżenia do wykorzystanych w pracy technik *in vivo*. Model ortotopowy jest z jednej strony bardzo trudny technicznie, a jednocześnie najbardziej miarodajny w tego typu

badaniach. Jednak wydaje się, że Autorka nieco niefrasobliwie podeszła do metodyki analiz *in vitro*. W pracy brakuje zdjęć komórek o rozdzielczości umożliwiającej dobrą wizualizację ich morfologii. Ponadto test transmigracji, który został wykorzystany do analiz inwazyjności komórek, nie oddaje bezpośrednio ich aktywności migracyjnej; do tego konieczna byłaby poklatkowa analiza ich przemieszczeń. Wreszcie, proliferację komórek najlepiej badać analizując zmiany liczby komórek po czasie. Testy metaboliczne, choć powszechnie stosowane, często zakłamują wyniki i generują trudności interpretacyjne. Z drugiej strony nie wydaje się, aby zastosowanie tych właśnie technik zasadniczo wpłynęło na jakość uzyskanych wyników, choć pewnie należy spodziewać się różnic na poziomie ilościowym. Opis metod jest na tyle kompletny i szczegółowy, że stwarza możliwość powtórzenia opisywanych doświadczeń przez osobę dysponującą odpowiednim sprzętem i wiedzą. Reasumując bardzo wysoko oceniam warstwę metodyczną rozprawy.

Równie wysoko oceniam treść i formę podrozdziałów, w których Doktorantka przedstawiła uzyskane wyniki, choć tu w kilku miejscach brakuje krótkich wstępów, a w szczególności konkluzji, które ułatwiłyby zrozumienie ciągów logicznych, rządzących wykonywanymi przez Autorkę doświadczeniami. Jednak już dobór strategii analitycznych nie budzi wątpliwości. Porównanie rozwoju guzów TRAMP-C1 i TRAMP-C2 generowanych w modelu ortotopowym i dożylnym potwierdziło wyższy potencjał „neoplastyczny” i metastatyczny komórek TRAMP-C2 w porównaniu z komórkami TRAMP-C1. Należy w tym miejscu podkreślić ogrom pracy, jaki Autorka włożyła w optymalizację protokołu transplantacji, w analizy kinetyki rozwoju guzów, jak i w określenie wzoru ich przerzutowania. Doświadczenia *in vivo* zostały zaprojektowane poprawnie i poprawnie wykonane, a liczba zwierząt wykorzystanych w doświadczeniach wedle mojej oceny zapewnia minimum „komfortu statystycznego”. Wyniki są dobrze udokumentowane, ich opis jest konkluzyjny i nie budzi wątpliwości. Całość stanowi więc dobrą podstawę dla bardziej szczegółowych analiz determinant zróżnicowanego rozwoju guzów obu badanych typów i zaangażowania układu opornościowego w powstawanie tych różnic.

Analizy mechanizmów odpowiedzialnych za wyższy potencjał neoplastyczny i metastatyczny komórek TRAMP-C2 wykazały m.in. wyższe poziomy unaczynienia tych guzów (potencjalnie związane z poziomami ET-2), i wyższą ekspresję niektórych cytokin „pro-inwazyjnych” (CCL2 i EGF) oraz metaloproteinaz w ich obrębie. Z kolei w badaniach systemowej odpowiedzi na rozwój nowotworów Autorka rozwinęła 2 podstawowe wątki badawcze. W pierwszym z nich określiła powiązania między rozwojem guzów w modelu ortotopowym a zmianami względnych liczb subpopulacji komórek układu odpornościowego. W drugim zaś skoncentrowała się na roli IL-33, jako możliwego mediatora odpowiedzi immunologicznej myszy TRAMP na rozwój syngenicznych guzów C1 i C2. Analizy morfologii krwi zwierząt zaszczepionych komórkami obu linii TRAMP pozwoliły zaobserwować różnice w reaktywności układu immunologicznego na rozwój guzów obu linii. Autorka wykazała mobilizację m.in. monocytów, leukocytów i limfocytów u zwierząt zaszczepionych komórkami TRAMP-C2. Skorelowane to było m.in. ze wzrostem frakcji  $T_{reg}$ , co też potwierdza wcześniejsze sugestie na temat korelacji między aktywacją układu odpornościowego gospodarza, a szybkością

rozwoju raka prostaty, oparte o analizy z wykorzystaniem komplementarnych modeli badawczych. Quantum danych przedstawionych w tej części rozprawy jest rzeczywiście imponujące, choć całość jest mniej konkluzyjna niż poprzednia część opisu wyników. Nieco też szkoda, że Autorka już na tym etapie nie pokusiła się o próbę syntezy uzyskanych wyników, na przykład w kierunku wytypowania źródeł opisanych w dalszej części rozprawy zmian poziomów IL-33.

Z kolei badania ekspresji i poziomów IL-33 w guzach TRAMP-C1 i TRAMP-C2, a także reaktywności komórek nowotworowych na tę cytokinę, pozwoliły wstępnie uznać ją, jako czynnik (współ)odpowiedzialny za różnice kinetyki rozwoju guzów obu typów. Na tym etapie badań Doktorantka zanalizowała powiązania między fenotypem komórek TRAMP-C1 i TRAMP-C2 i ich reaktywnością na IL-33. Z wykorzystaniem kilku komplementarnych metod Autorka pokazała wyższy potencjał inwazyjny/lekooporność komórek TRAMP-C2, co współgra z wynikami analiz *in vivo* i *ex vivo*, a także z paraboliczną zależnością między poziomem IL-33 a wzrostem i transmigracją komórek. Pewne wątpliwości dotyczące metodyki analiz proliferacji i ruchliwości komórek omówiłem wcześniej, natomiast dane nt. zaangażowania IL-33 w regulację wydajności promocji i progresji raka prostaty są bez wątpienia ważnym przyczynkiem do dalszych analiz mechanistycznych.

Dyskusja i krótki rozdział zatytułowany "Wnioski", który jest raczej podsumowaniem poczynionych obserwacji, zawierają syntezę znaczenia uzyskanych przez Autorkę wyników. Odnosząc się do kwestii zawartych w obu rozdziałach można stwierdzić, że synteza ta została przeprowadzona na tle aktualnie dostępnych danych literaturowych, co potwierdza dobrą orientację Autorki w zagadnieniach będących przedmiotem rozprawy. Na tym etapie badań zarówno złożoność interakcji między rozwijającym się nowotworem a układem odpornościowym gospodarza, jak i specyfika modelu badawczego czynią wiążącą interpretację uzyskanych wyników niemożliwą, a przynajmniej ryzykowną. Jednak uzyskane wyniki jasno pokazują korelację między kinetyką rozwoju guzów TRAMP-C2 a potencjałem inwazyjnym komórek, ich zdolnością do mobilizacji układu odpornościowego, czy też lokalnymi poziomami metaloproteinaz. Ponadto udało się nakreślić pewne ramy interpretacyjne dot. zaangażowania układu odpornościowego w regulację procesu rozwoju guzów prostaty TRAMP-C1/C2, w tym roli IL-33, które choć w części oparte na spekulacjach, są przekonujące. Trochę szkoda, że Autorka nie zdobyła się na odważniejsze dywagacje na temat roli poszczególnych populacji komórek układu odpornościowego w promocji i progresji guzów TRAMP-C2 w kontekście zaangażowania IL-33. Nie podważa to jednak wagi uzyskanych wyników ani nie kwestionuje wysokiej wartości merytorycznej i metodycznej rozprawy. Tym bardziej, że weryfikacja znaczenia parabolicznego wzoru zależności aktywności proliferacyjnej i potencjału inwazyjnego komórek obu linii od stężenia IL-33 to bardzo ciekawy trop badawczy do wykorzystania w przyszłości.

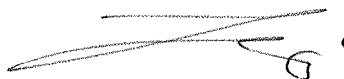
Z drugiej strony lektura tej części rozprawy nasunęła mi się kilka pytań:

- nowotwory, w tym nowotwory prostaty, wykazują dużą fenotypową heterogenność budujących je komórek. Czy wiadomo coś na temat dywersyfikacji fenotypowej komórek w guzach TRAMP-C1 i TRAMP-C2, jej „regionalizacji” i ewentualnych powiązań między tym zjawiskiem, a zdolnością guzów do tworzenia frontu inwazyjnego?

- czy obserwowano heterogenność rozmieszczenia IL-33 wewnątrz guzów i czy może wpływać ona na lokalne zdolności adaptacyjne komórek lub/i rozwój frontu inwazyjnego?

- jaka jest genetyka zmian poziomów niektórych aminokwasów? Czy wynikają one z konkurencji między gospodarzem a rozwijającym się nowotworem, czy też mogą być przejawem adaptacji lub/i samoobrony gospodarza? Jak pogodzić pronowotworowy wpływ aktywności układu odpornościowego myszy z postulowanym w pracy immunosupresyjnym wpływem deficytu aminokwasów?

Reasumując, podjęte przez Autorkę badania dotyczą bardzo ważnej kwestii, pośrednio odnoszącej się do problemów klinicznych związanych z upośledzoną reakcją układu odpornościowego na rozwój nowotworu prostaty. Badania przeprowadzone w ramach pracy i uzyskane wyniki mogą przyczynić się do głębszego „rozpracowania” modelu opartego o szczep myszy TRAMP i racjonalizacji jego wykorzystania w badaniach nowotworu prostaty, w tym w analizach molekularnych mechanizmów rządzących tym procesem. Mogą też przelożyć się na lepsze zrozumienie genetyki różnorodnych reakcji komórek układu odpornościowego. W tym miejscu warto jeszcze raz zwrócić uwagę na stopień skomplikowania modelu badawczego, a w szczególności ortotopowego modelu raka prostaty *in vivo*. Implantacja komórek jest w tym modelu bardzo czaso- i pracochłonna, wymaga też zegarmistrzowskiej precyzji. Mimo, że na tym etapie badań konieczne były również intuicyjne oceny rysujących się tendencji, w perspektywie opracowane przez Autorkę podejście może przyczynić się do dalszej optymalizacji modelu i stworzenia „złotego standardu” badań nad problemem interakcji między nowotworami prostaty i układem odpornościowym gospodarza. Podsumowując, rozprawa spełnia wszelkie ustawowe wymogi rozprawy doktorskiej określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r., poz. 85 z późn. zm.). Przedkładałam zatem Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Jarosz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę potencjał przedstawionych w rozprawie wyników i jej bogactwo metodyczne, a także dotychczasowy dorobek naukowy Autorki, wnoszę również o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



(Jarosław Czyż)

