



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII  
ZAKŁAD BIOLOGII KOMÓRKI  
KIEROWNIK ZAKŁADU  
PROF. DR HAB. ZBIGNIEW MADEJA

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Justyny Wądryńskiej pt. „Relacje pomiędzy komórkami czerniaka a wybranymi komórkami mikrośrodowiska tego nowotworu”**

Nowotwory złośliwe, w tym czerniak, stanowią jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny. Pomimo znacznych postępów w diagnostyce i leczeniu tych chorób, ich złożoność nadal stanowi olbrzymi problem terapeutyczny. Tradycyjne metody leczenia, takie jak chemioterapia, często nie przynoszą oczekiwanych rezultatów, co skłania badaczy do poszukiwania nowych, bardziej skutecznych podejść terapeutycznych. W ostatnich latach dużą nadzieję pokłada się w terapiach celowanych oraz immunoterapii, które wykorzystują specyficzne molekularne mechanizmy nowotworów do ich zwalczania. Niemniej jednak jedną z największych przeszkód w skuteczności zarówno tradycyjnej chemioterapii jak i wielu terapii nowej generacji pozostaje zjawisko lekooporności, które znacznie utrudnia walkę z chorobą.

Mikrośrodowisko nowotworu, na które składają się nie tylko komórki nowotworowe, ale również różnorodne komórki towarzyszące, odgrywa kluczową rolę w progresji czerniaka oraz w rozwoju oporności na leczenie. Wśród tych komórek znajdują się m.in. fibroblasty, adipocyty oraz keratynocyty, które początkowo mogą hamować rozwój nowotworu, ale z czasem ulegają transformacji pod wpływem sygnałów wysyłanych przez komórki nowotworowe, wspierając tym samym jego rozwój. Zrozumienie interakcji pomiędzy komórkami czerniaka a komórkami mikrośrodowiska jest zatem kluczowe dla opracowania skuteczniejszych terapii. Nic więc dziwnego, że badania nad interakcjami między komórkami nowotworowymi a ich mikrośrodowiskiem budzą ogromne zainteresowanie. Ponieważ najbardziej niebezpieczną cechą czerniaka jest jego zdolność do tworzenia przerzutów, zrozumienie i możliwość modulowania tych interakcji może prowadzić do opracowania nowych strategii terapeutycznych.

Praca doktorska mgr Justyny Wądryńskiej koncentruje się na badaniu wzajemnych oddziaływań między komórkami czerniaka a elementami mikrośrodowiska tego nowotworu. Celem pracy jest analiza, w jaki sposób fibroblasty, keratynocyty oraz adipocyty związane z nowotworem wpływają

na procesy związane z progresją czerniaka. Autorka stosuje zróżnicowane modele badawcze, w tym hodowle w kokulturach, aby szczegółowo zbadać te złożone interakcje.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Patologii Komórki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem Pani Prof. Doroty Nowak. Zespół, w którym wykonano badania, od wielu lat zajmuje się badaniem mechanizmów tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe.

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 170 stron. W tekście zamieszczono 53 ryciny, 12 tabel i cytowano 336 pozycji literaturowych. Rozprawa doktorska Pani Justyny Wądryńskiej ma typowy dla tego typu opracowań układ. W 32 stronicowym bogato ilustrowanym „Wstępie” autorka przedstawiła starannie przygotowany zestaw informacji ułatwiający czytelnikowi zrozumienie całości pracy. Wstęp do pracy doktorskiej Justyny Wądryńskiej wprowadza czytelnika w tematykę czerniaka, jednego z najbardziej agresywnych nowotworów skóry, omawiając różne formy terapii stosowane w jego leczeniu. Następnie przedstawia mikrośrodowisko nowotworu, skupiając się na roli keratynocytów, fibroblastów oraz adipocytów w niszy nowotworowej. Opisuje, jak te komórki wpływają na proliferację, inwazję, aktywność przerzutową oraz lekooporność czerniaka. W szczególności, Autorka koncentruje się na interakcjach pomiędzy komórkami czerniaka a keratynocytami, fibroblastami i adipocytami. Jednakże, na zakończenie tego rozdziału, omówione są również komórki układu immunologicznego obecne w niszy nowotworowej. Wstęp napisany jest przejrzysto i dobrze wprowadza czytelnika do zagadnień będących przedmiotem pracy doktorskiej. Jednak, po przeczytaniu tego rozdziału można odczuć lekki niedosyt, spowodowany brakiem odniesienia się do wpływu bezpośrednich kontaktów fizycznych między różnymi typami komórkami na ich aktywnością migracyjną i metastatyczną. Włączenie tej kwestii mogłoby jeszcze bardziej pogłębić zrozumienie złożonych interakcji w mikrośrodowisku nowotworu szczególnie w kontekście jego wpływu na aktywność metastatyczną komórek czerniaka.

W rozdziale „Materiały i metody” Autorka szczegółowo przedstawia zastosowane metody eksperymentalne oraz opisuje użyty materiał biologiczny. Doktorantka wykorzystała szeroki zakres technik zarówno biochemicznych, jak i biologicznych, które są adekwatne do rozwiązania problemów badawczych omówionych w rozprawie doktorskiej. Opis metod jest jasny i precyzyjny, co umożliwia ich powtórzenie w przyszłych badaniach. Jednakże, w związku z użyciem komórek HaCat i wspomnianym zresztą przez Autorkę różnicą pomiędzy pierwotnymi keratynocytami a komórkami HaCat (m.in. odmienne różnicowanie w obecności surowicy i jonów wapnia, morfologia oraz profil ekspresji genów), interesujące byłoby przedstawienie w pracy chociażby kilku wyników uzyskanych na pierwotnych keratynocytach. Tym bardziej, że jak sama Doktorantka pisze na stronie 84, takie wyniki uzyskano. Ponadto interesujące jest w jaki sposób wpływało (jeśli wpływało) użycie

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII UJ

pożywek hodowlanych będących mieszaniną mediów optymalnych dla różnych typów komórek na kondycję poszczególnych typów badanych komórek w hodowli in vitro (rozdział 3.5.1.4)?

W rozdziale „Wyniki” autorka przedstawiła główne osiągnięcia swoich badań dotyczących interakcji pomiędzy komórkami czerniaka a komórkami towarzyszącymi w mikrośrodkowisku nowotworu. Najważniejsze obserwacje poczynione przez Autorkę to wykazanie wpływu komórek czerniaka na komórki mikrośrodkowiska, w szczególności:

**1. Zwiększenie zdolności migracyjnych i inwazyjnych komórek związanych z nowotworem:**

- Fibroblasty (CAFs) wykazywały wzrost zdolności do migracji, inwazji oraz proteolizy w warunkach kokultury z komórkami czerniaka. Zaobserwowano również zwiększone wydzielanie mleczanu oraz prozapalnych cytokin i białek zaangażowanych w angiogenezę, szczególnie w odpowiedzi na wysoce inwazyjne linie czerniaka (A375, WM9, Hs294T).
- Keratynocyty (CAKs) hodowane z komórkami czerniaka wykazywały cechy komórek niezróżnicowanych oraz wzrost zdolności do proteolizy, co było związane z podwyższonym poziomem proteaz (MMP3, ADAM, MMP9, MMP14) oraz spadkiem poziomu inhibitorów proteaz (TIMPs).
- Adipocyty (CAAs) wykazywały wrzecionowatą morfologię przypominającą fibroblasty, ze zmniejszoną ilością kropli lipidowych oraz podwyższoną fosforylacją białek ERK i STAT, co prowadziło do nasilonej lipolizy i zwiększonego wydzielania czynników angiogennych oraz cytokin.

Doktorantka wykazała również znaczący:

**2. Wpływ komórek towarzyszących na biologię komórek czerniaka:**

- Komórki czerniaka hodowane z fibroblastami, adipocytami i keratynocytami wykazywały zwiększoną fosforylację białka STAT3, co może wpływać na procesy związane z progresją nowotworu.
- Obecność fibroblastów i keratynocytów w hodowli z niektórymi typami komórek czerniaka prowadziła do zwiększonej proliferacji komórek nowotworowych.
- Inkubacja komórek czerniaka z fibroblastami i adipocytami powodowała podwyższenie poziomu markerów przejścia epithelialno-mezenchymalnego (EMT), co sprzyja powstawaniu przerzutów.

- W hodowli z adipocytami obserwowano akumulację lipidów w komórkach czerniaka, co może wpływać na metabolizm nowotworu.

Reasumując, Autorka otrzymała interesujące i spójne wyniki jednoznacznie wskazujące, że interakcje pomiędzy komórkami czerniaka a towarzyszącymi elementami mikrośrodowiska (fibroblastami, adipocytami, keratynocytami) odgrywają kluczową rolę w progresji nowotworu. Zrozumienie tych oddziaływań może w przyszłości stanowić podstawy do opracowania terapii celujących nie tylko w komórki nowotworowe, ale także w komórki wspierające rozwój nowotworu, co może prowadzić do bardziej skutecznych strategii leczenia czerniaka

Lektura wyników prezentowanych w ocenianej pracy była bardzo interesująca i nasunęła również kilka pytań:

1/ Jak można wyjaśnić różnice sygnału dla białka FAP przy stymulacji fibroblastów pożywką warunkowaną przez komórki czerniaka linii Hs294T przedstawione na rycinach 18 i 19A? Na rycinie 18 wydaje się, że akurat dla tej linii komórek czerniaka sygnał jest słabszy niż dla pozostałych linii komórek nowotworowych.

2/ Wydaje mi się, że w przypadku analizy sekretomu byłoby interesujące przedstawienie albo w załączniku do pracy albo w rozdziale „Materiały i Metody” listy tych białek, których poziom nie ulegał zmianie po aktywacji komórkami czerniaka.

3/ Dlaczego do wizualizacji komórek w teście degradacji żelatyny użyto akurat barwienia F-aktyny? Barwienie aktyny filamentarnej nie jest chyba najlepszym sposobem do obrazowania pełnego kształtu komórki.

4/ Czy nie było możliwości przeprowadzenia analizy ilościowej sygnału fluorescencyjnego z obrazów mikroskopowych w badaniach zawartości lipidów w komórkach CAA (rycina 43)?

5/ W jaki sposób w doświadczeniach, w których mierzono wydzielanie mleczanu w kokulturach (rycina 46) wykluczano mleczan produkowany przez same komórki czerniaka? Czy to była dodatkowa inkubacja po usunięciu insertu z komórkami nowotworowymi? To nie do końca było dla mnie jasne z opisu metodyki.

6/ Przedstawione wyniki wpływu komórek wchodzących w skład TME na proliferację komórek czerniaka (rozdział 4.4) wskazują, że wpływ ten nie był zbyt duży i dotyczył tylko niektórych układów komórkowych. Z drugiej strony większość przedstawionych w pracy wyników wskazuje, że wzajemne interakcje pomiędzy komórkami prawidłowymi i nowotworowymi zmieniają wiele parametrów istotnych dla procesów inwazji i metastazy. Dlaczego nie przeprowadzono doświadczeń badających wpływ komórek TME na migrację i inwazyjność komórek czerniaka?

W 15-stronicowym rozdziale „Dyskusja” autorka krytycznie i ostrożnie ocenia własne wyniki na tle danych literaturowych, co świadczy o jej dogłębnej znajomości tematu i umiejętności interpretacji wyników w szerszym kontekście naukowym. Autorka przeprowadza szczegółową analizę uzyskanych rezultatów, porównując je z najnowszymi odkryciami w dziedzinie badań nad czerniakiem oraz interakcjami w mikrośrodowisku nowotworu. W dyskusji autorka wykazuje się wysokim poziomem krytycznego myślenia, rozważając zarówno możliwości, jak i ograniczenia swoich badań. Rozprawę kończy bardzo czytelny rozdział „Wnioski”, w którym przedstawiono główne osiągnięcia badawcze i konkluzje płynące z przeprowadzonych badań. Wnioski są jasne i spójne, podkreślając znaczenie interakcji między komórkami nowotworowymi a mikrośrodowiskiem w kontekście progresji czerniaka oraz potencjalnych strategii terapeutycznych.

Oceniana rozprawa doktorska została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. W całym tekście można znaleźć jedynie nieliczne uchybienia tej natury. Z obowiązku recenzenta chciałbym jedynie zwrócić uwagę na niezbyt szczęśliwe moim zdaniem określenia „inhibicja apoptozy” (str. 6) i „inwadują przez matryżel” (str. 71)

Przedstawione tutaj uwagi i pytania w żadnym stopniu nie wpływają na jak najbardziej pozytywną ocenę całej pracy doktorskiej. Wręcz przeciwnie, świadczą o tym, że prace czyta się z dużym zainteresowaniem a otrzymane wyniki są zachętą do stawiania wielu nowych pytań.

Warto zauważyć, że Pani Justyna Wądryńska jest ponadto współautorką 10 prac naukowych opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach. Prace te były już 175 razy cytowane w literaturze światowej. Na uwagę zasługują również fakt, że wyniki pracy doktorskiej zostały opublikowane w 4 pracach eksperymentalnych w takich czasopismach jak: BBA, Cell Communication and Signaling i CMBL. Ponadto z tematyką doktoratu ściśle związane są 3 prace przeglądowe. Prace te były już 146 cytowane w innych publikacjach. Jest to niewątpliwie bardzo dobre osiągnięcie publikacyjne. Nie jestem wielkim zwolennikiem przygotowywania doktoratów w postaci tzw. „spinki” publikacji ale akurat w tym wypadku nie byłoby żadnych wątpliwości co do wiodącej roli doktorantki. W 3 publikacjach eksperymentalnych jest pierwszą autorką a jednej drugą. Pierwszą autorką jest również w jednej pracy przeglądowej. Również ze względu na wielowątkowość pracy, przedstawienie doktoratu jako wyników kilku prac, w kilku oddzielnych publikacjach stanowiących odrębne całości, byłoby chyba łatwiejsze w odbiorze dla czytelnika.

Podsumowując, zarówno dorobek naukowy jak i rozprawę doktorską Pani mgr Justyny Wądryńskiej oceniam bardzo wysoko. W moim przekonaniu autorka uzyskała wartościowe, stanowiące nowość naukową wyniki, które otwierają szerokie perspektywy badawcze na przyszłość.

Przedstawiona do oceny praca spełnia wszelkie wymogi rozprawy doktorskiej określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zmianami). Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr Justyny Wądryńskiej przez Radę Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie stopnia doktora nauk biologicznych. Jednocześnie, ze względu na fakt, że praca doktorska była już źródłem opublikowania 7 bardzo dobrych prac naukowych, zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o rozważenie możliwości wyróżnienia ocenianej pracy.

*(Zbigniew Madeja)*