



Białystok, dnia 14.10.2019 r.

Ocena rozprawy doktorskiej
pt. „Wpływ insuliny i insulino-podobnych czynników wzrostu
na komórki raka nerki”
lek. Wojciecha Jakuba Solarka
z Centrum Biostruktury
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Rak nerki nie jest bardzo częstym nowotworem. *De facto* odpowiada on za 2-3% zachorowań na nowotwory złośliwe u dorosłych, ale zachorowalność i śmiertelność z jego powodu wykazują trend wznoszący. W skali globalnej nowotwór ten rozpoznawalny jest u ponad 200 tys. osób rocznie. W Polsce zaś odnotowuje się nieco ponad 5 tys. nowych przypadków w skali roku. W 2015 r. rak nerki był 6. najczęstszym nowotworem rozpoznawanym u mężczyzn i 9. u kobiet. Bardzo często jest on wykrywany w stadium zaawansowanym, co negatywnie wpływa na wyniki leczenia. Zarówno w skali globalnej, jak i krajowej około połowa przypadków kończy się zgonem. Większość rozpoznań histopatologicznych (ok. 75%) raka nerki, to rak jasnokomórkowy. W znacznej części (>50%) tego typu raków nerki stwierdza się mutację w genie supresorowym *von Hippel-Lindau* (VHL) skutkującą nadekspresją HIF1a i HIF2a, VEGF i PDGF, a w efekcie aktywacją szlaków przekazywania wewnątrzkomórkowego związanych z PI3K-AKT-mTOR oraz Ras-MAPK. Identyfikacja powyższych zaburzeń molekularnych, a także nieprawidłowości w zakresie odpowiedzi immunologicznej doprowadziły do wprowadzenia do terapii

drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz tyrozynowych (sorafenib, sunitynib, pazopanib, aksytynib) i inhibitorów mTOR (ewerolimus, temsirolimus). W leczeniu chorych na raka nerki stosuje się również przeciwciała monoklonalne, których użycie skutkuje reaktywacją układu immunologicznego. Aktualnie na świecie trwają szeroko zakrojone badania nad identyfikacją innych czynników patogenetycznych u chorych na raka nerki. W ten nurt doskonale wpisuje się recenzowana praca doktorska. Temat doktoratu jest zatem ciekawy, bardzo aktualny i ważny zarówno z punktu widzenia biologii raka nerki, jak i perspektyw leczenia chorych na ten nowotwór.

Przedłożona do oceny praca doktorska ma formę monografii, zawierającej 86 stron wydruku komputerowego. Ma układ typowy dla tego rodzaju rozpraw. W jej skład wchodzi 7 rozdziałów, które pojawiają się w następującej kolejności: „Przegląd literatury”, „Cele pracy”, „Materiał i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Wnioski”, „Bibliografia”. Zasadniczy tekst pracy jest poprzedzony 4-stronicowymi streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz 3-stronicowym wykazem skrótów, który jest bardzo przydatny w czasie lektury niniejszej dysertacji.

Rozprawę rozpoczyna zawarty na 18 stronach wydruku komputerowego „Przegląd literatury”, w którym lek. Jakub Solarek wnikliwie opisał epidemiologię raka nerki, rolę insulinopodobnych czynników wzrostu (IGF), a także ich receptorów w patomechanizmie nowotworzenia. W dalszej części tego rozdziału została opisana rola insuliny i IGF w rozwoju raka nerki, przy czym autor zwrócił szczególną uwagę na mechanizmy molekularne obserwowane w modelach *in vitro* i *in vivo* raka nerki, a także rolę ścieżek przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych powiązanych z receptorem IGF-1R i receptorem dla aktywowanej kinazy C1 (RACK1). Uwzględnił ponadto możliwości zahamowania funkcji receptora IGF-1R w modelu komórkowym tego nowotworu. Następnie doktorant skoncentrował się na wpływie cukrzycy na ryzyko zachorowania na raka nerki. W końcowej

części tego rozdziału odniósł się do możliwości wykorzystania IGF-1 i IGF-1R jako czynników predykcyjnych i prognostycznych u chorych na raka nerki. Ta część dysertacji stanowi bardzo dobre wprowadzenie do następnego rozdziału, jakim są cele pracy.

Cele pracy zostały sformułowane w formie opisowej. Autor za cel pracy obrał sobie zweryfikowanie hipotezy, że insulina i insulinopodobne czynniki wzrostu wpływają stymulująco na raka nerki, być może na zasadzie funkcjonowania pętli wzajemnego pobudzania na drodze para- i autokrynnej. W tym celu zaplanował analizę ekspresji receptorów insuliny i IGF oraz ich wpływu na proliferację, wzrost i migrację komórek raka nerki planując ich ocenę na poziomie molekularnym poprzez badanie ekspresji genów. Cele pracy są opisane w sposób nieco zawiły, zawierają też powtórzenie treści. Bardziej przejrzyste byłoby zredagowanie ich w formie enumeratywnej.

Rozdział „Materiał i metody” został zawarty na 11 stronach wydruku komputerowego. W początkowej części doktorant opisuje linie komórkowe i zasady prowadzenia hodowli komórkowej. W eksperymentach własnych lek. Wojciech Solarek wykorzystał aż 7 linii komórkowych (5 linii raka nerki i 2 linie prawidłowych komórek nerkowych), a mianowicie:

- Linię 786-O raka nerki (linia nie posiada funkcjonalnego genu *VHL* i charakteryzuje się wysoką ekspresją VEGF)
- Linię 769-P raka nerki (zmutowany gen *VHL*)
- Linię Caki-1 raka nerki (funkcjonalny gen *VHL* i sekrecja zwiększonej ilości VEGF)
- Linię Caki-2 raka nerki (linia charakteryzuje się wysoką ekspresją białka *VHL* i brakiem ekspresji HIF-2a)
- Linię ACHN raka nerki (brak mutacji w genach *VHL* i *HIF-1a*, polimorfizm w genie *c-myc*)
- Linię HEK293 kontrolną wywodzącą się z nerki embrionalnej (stosowana w

modelach fizjologicznych komórek nerki)

- Linię PCS-400-010 kontrolną pochodzącą z kanalika bliższego zdrowej nerki (obecność funkcjonalnego białka VHL zależy od gęstości hodowli komórkowej i jest największa w przypadku znacznego jej zagęszczenia)

Wszystkie linie komórkowe raka nerki pozyskano z ATCC (*American Type Culture Collection*), *Bioresource Center, Manassas, VA, USA*.

W dalszej części tego rozdziału doktorant opisuje badane cząsteczki – insulinę, IGF1, IGF2, a także dwa użyte inhibitory receptora insuliny: niespecyficzny HNMPA-(AM)₃ i specyficzny - pikropodofilinę (PPP). W przeprowadzonych eksperymentach doktorant oceniał żywotność komórek za pomocą testu *Alamar Blue*, ich proliferację, a także ich zdolność do przemieszczania się w teście gojenia rany (*Wound Healing Assay*). W badaniach własnych lek. Wojciech Solarek posłużył się szeregiem nowoczesnych technik, a mianowicie cytometrią przepływową, analizą białek w technologii Luminex xMAP, testami ELISA oraz oceną ekspresji genów techniką RT-qPCT. Zastosowana przez doktoranta analiza statystyczna nie budzi zastrzeżeń.

Rozdział „Wyniki” został przedstawiony na 18 stronach wydruku komputerowego. Lek. med. Wojciech Solarek dokumentuje w nim, że insulinopodobne czynniki wzrostu zwiększają żywotność i potencjał migracyjny komórek raka nerki. Doktorant wykazał, że badane przez niego linie raka nerki posiadają receptor IGF-1R, można je też stymulować stosując IGF. Co ciekawe, żadna z linii komórkowych raka nerki oraz linia kontrolna prawidłowych komórek nerki nie posiadały receptora IR, przy czym wyniki badania cytometrycznego zostały potwierdzone przez doktoranta przy użyciu dwóch innych metod (ELISA oraz technologia Luminex) analizy białek uzyskanych z lizatów badanych linii komórkowych. Interesujące jest, że pomimo braku receptora dla insuliny, komórki raka nerki odpowiadały na stymulację insuliną. Zwiększały one swoją żywotność i zdolność do migracji,

co prawdopodobnie było efektem wpływu insuliny na receptor IGF-1R. Lek. Wojciech Solarek wykazał, że receptory IGF-1R oraz IR ulegają fosforylacji po stymulacji IGF-1, IGF-2, jak i insuliną. Takie symultaniczne oddziaływanie insulinopodobnych czynników wzrostu na oba receptory może nasilać ich wpływ na wzrost i proliferację komórek raka nerki. Doktorant wykazał, że komórki raka nerki nie wydzielają insuliny, IGF-1 oraz IGF-2, natomiast powyższe czynniki wzrostu wpływają na zmianę ekspresji genów, powiązanych ze ścieżką przekazywania sygnałów inicjowanych przez ekspozycję tych komórek na insulinę i insulinopodobne czynniki wzrostu. Rozdział ten jest bardzo zasobny w informacje. Jest bogato zilustrowany i stabelaryzowany. W rozprawie doktorant zamieścił łącznie 11 złożonych rycin i 6 tabel, które potwierdzają ogrom pracy doświadczalnej wykonanej przez doktoranta, a jednocześnie bardzo ułatwiają percepcję tekstu rozprawy. Ten rozdział jest niewątpliwym atutem recenzowanej pracy.

„Dyskusja” została przeprowadzona na 11 stronach tekstu. Jest ona rzeczowa, zawiera liczne odniesienia do piśmiennictwa i potwierdza wysokie kompetencje doktoranta w zakresie tematu dysertacji.

Rozprawę wieńczy rozdział „Wnioski”. Zostały one przedstawione opisowo, co powoduje, że nie są one wyraziste. Częściowo są powtórzeniem wyników, a nie wnioskami *sensu stricto*. Wydają się, że lepiej prezentowałyby się w znacznie prostszej, ogólnie przyjętej enumeratywnej formie.

Dobrze dobrane „Piśmiennictwo” liczy 110 pozycji. Zostały one przedstawione w porządku alfabetycznym. Doktorant uwzględnił publikacje zarówno archiwalne, jak i najnowsze, w tym 26 pochodzących z lat 2015-2019. Szkoda, że nie zadał sobie dodatkowego trudu ponumerowania publikacji, co jest wymogiem standardowym w większości uczelni.

Z obowiązku recenzenta muszę zaznaczyć, że w pracy doktorskiej znalazłem błędy

literowe, o których informację przekazałem doktorantowi w formie ustnej. Nie mają one jednak wpływu na wartość dysertacji, którą oceniam wysoko.

Reasumując, praca doktorska lek. Wojciecha Jakuba Solarka jest opracowaniem bardzo ciekawym i wartościowym. Bez wątplenia, wzbogaca wiedzę o biologii raka nerki i prezentuje pewną wartość aplikacyjną. Spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora nauk medycznych. Przedłożoną mi do oceny rozprawę oceniam wysoko i wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Wojciecha Jakuba Solarka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Kliniki Onkologii
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
prof. dr hab. med. Marek Wojtukiewicz