



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.hirszfeld.pl

Akceptuje HJm

Wrocław, 15 czerwca 2023 roku

dr hab. n. med. Joanna Rossowska
Międzyzakładowa Pracownia Cytometrii i Mikroskopii Konfokalnej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
ul. Weigla 12
53-114 Wrocław

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. KINGI WILKUS-ADAMCZYK

**PT. "THE INFLUENCE OF TUMOR MICROENVIRONMENT ON THE ACTIVITY AND GENE EXPRESSION
PROFILE OF ORGANOSPECIFIC ENDOTHELIAL CELLS"**

PROMOTOR: PROF. DR HAB. CLAUDINE KIEDA

PROMOTOR POMOCNICZY: DR KLAUDIA BRODACZEWSKA

Rak piersi jest najczęściej rozpoznawanym nowotworem złośliwym wśród kobiet. Nowotwór ten charakteryzuje się dużą heterogennością, co decyduje o zmiennych cechach patologicznych i rokowaniu. Wyniki badań wskazują, że aż u 20-30% pacjentek z rakiem piersi zdiagnozowanym we wczesnym stadium rozwiną się przerzuty. Pomimo postępu w leczeniu pacjentek z rakiem piersi, zapobieganie nawrotom i przerzutom wciąż stanowi duże wyzwanie. Na proces przerzutowania ma wpływ cała kaskada zdarzeń i procesów biologicznych, które ostatecznie prowadzą do rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych z guza pierwotnego do odległych miejsc w organizmie (w przypadku raka piersi są to najczęściej przerzuty do kości, wątroby, płuc i mózgu). W tym złożonym procesie angiogeneza odgrywa szczególną rolę.

Badania podstawowe i kliniczne wykazały, że czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) jest dominującym czynnikiem angiogenym w raku piersi, a jego ekspresja koreluje ze stadium zaawansowania choroby. Oprócz VEGF, w raku piersi odnotowuje się ekspresję innych czynników proangiogennych, a wśród nich TGF- β , czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), czy płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF). Nagromadzenie czynników indukujących angiogenezę, jak również waskulogenezę, prowadzi do nadmiernego, niekontrolowanego wzrostu mikronaczyń w środowisku nowotworowym (TME). Natomiast wysoka gęstość unaczynienia w raku piersi jest skorelowana z większym prawdopodobieństwem choroby przerzutowej i krótszym czasem przeżycia.

Pomyślne wyniki badań klinicznych pozwoliły na wprowadzenie do użytku klinicznego kilku inhibitorów angiogenezy, które stosowane są obecnie w leczeniu pacjentów z zaawansowanymi nowotworami litymi. Są to głównie przeciwciała monoklonalne lub małowcząsteczkowe inhibitory kinazy tyrozynowej ukierunkowane na VEGF i jego receptory. Udowodniono, że zablokowanie aktywności czynników proangiogennych w mikrośrodowisku nowotworowym nie tylko zmniejsza dostępność składników odżywczych niezbędnych dla przeżycia komórek nowotworowych, ale również prowadzi do normalizacji naczyń, a w konsekwencji zmniejszenia hipoksji w guzie nowotworowym oraz lepszego dostępu dla substancji terapeutycznych. Pomimo korzystnych wyników stosowania inhibitorów angiogenezy w różnych typach guzów litych, w raku piersi leki te nie przyniosły spodziewanych efektów w postaci przedłużenia czasu życia. W związku z tym, jednym z zasadniczych aspektów poprawy skuteczności leków antyangiogennych jest lepsze zrozumienie biologii naczyń w różnych typach i stadiach raka piersi. Poznanie mechanizmów molekularnych napędzających sygnalizację angiogenną w raku piersi przyczyni się bowiem do poznania nowych celów terapeutycznych.

Wychodząc naprzeciw oczekiwaniom, Doktorantka postawiła sobie ambitne cele, a wśród nich scharakteryzowanie nowego modelu badawczego organospecyficznego komórek śródbłonka (ECs) izolowanych z raka piersi, określenie wpływu mikrośrodowiska nowotworowego na powstanie nowych cech specyficznych dla ECs izolowanych z guza nowotworowego, oraz opisanie globalnego wzorca ekspresji genów charakterystycznych dla patologicznych ECs.

Pracę doktorską stanowi zgodnie z artykułem 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku „Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce” zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie 2 artykułów naukowych (jednej pracy przeglądowej i jednej oryginalnej) o łącznym współczynniku wpływu IF 12,416. W pracy przeglądowej Doktorantka jest pierwszym autorem razem z panią Aleksandrą Majewską, natomiast w pracy oryginalnej jest pierwszym autorem, a jednocześnie autorem korespondencyjnym. Oprócz załączonych publikacji Doktorantka zamieściła w rozprawie streszczenie w języku polskim i angielskim oraz autoreferat obejmujący wprowadzenie, cel badań, wnioski, jak również abstrakty dwóch prac zawierających wyniki badań będących kontynuacją badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej.

We wprowadzeniu Doktorantka w sposób zwięzły i rzeczowy przedstawiła zagadnienie angiogenezy w guzie nowotworowym oraz udziału hipoksji w kształtowaniu mikrośrodowiska nowotworowego uzasadniając jednocześnie konieczność podjęcia badań nad organospecyficznymi modelami śródbłonek.

Cel pracy został przedstawiony w sposób jasny, chociaż nietypowy. Sekcja ta została również wzbogacona o krótki opis zawartości prac.

W pracy przeglądowej „Endothelial Cells as Tools to Model Tissue Microenvironment in Hypoxia-Dependent Pathologies”, opublikowanej w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*, Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat biologii, heterogenności i modeli komórek śródbłonka. Niniejsza praca stanowi zbiór bardzo praktycznych informacji, które nie tylko wprowadzają czytelnika w zagadnienie, ale również stanowią solidną bazę informacji dla osób planujących badania nad procesem angiogenezy. W rozdziale zatytułowanym „Characteristic and Functions of EC” przedstawione zostały szczegółowe informacje na temat fenotypu ECs wraz z tabelą wyliczającą wszystkie charakterystyczne markery antygenowe dla tych komórek, ich występowanie i funkcje. Opisane zostały również procesy regulujące heterogenność populacji ECs, wpływ microRNA na właściwości i funkcje ECs, oraz funkcje ECs w organizmie i sposoby ich badania w warunkach *in vitro*. W kolejnym rozdziale pracy Doktorantka opisała dostępne modele ECs poczynając od progenitorowych komórek śródbłonka, poprzez organospecyficzne dojrzałe śródbłoneki, śródbłoneki różnicowane

z indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych (iPSCs), kończąc na omówieniu korzyści i ograniczeń płynących ze stosowania unieśmiertelnionych linii ECs. Praca zawiera również informacje na temat możliwości wykorzystania ECs w zaawansowanych modelach badawczych takich jak sferoidy, organoidy. W ostatnim rozdziale pracy przeglądowej Doktorantka wprowadza w zagadnienia roli ECs w procesie angiogenezy i stanach chorobowych. Podsumowując, praca przeglądowa wchodząca w skład rozprawy doktorskiej stanowi kompleksowe podsumowanie wiedzy w zakresie biologii śródbłonnków i dostępnych modeli badawczych. Stanowi również solidne wprowadzenie do zagadnień podejmowanych w pracy oryginalnej.

W pracy oryginalnej pt. „Distinctive Properties of Endothelial Cells from Tumor and Normal Tissue in Human Breast Cancer”, która została opublikowana w 2021 roku w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*, zostały przedstawione wyniki badań dotyczące charakterystyki dwóch unieśmiertelnionych linii śródbłonka pochodzących z guza nowotworowego i tkanki prawidłowej, izolowanych od pacjentki z rozpoznaniem rakiem piersi. Celem badań było określenie różnic w fenotypie oraz transkryptomie badanych linii, oraz porównanie ich aktywności biologicznej. We wstępie Doktorantka podkreśla, że stworzenie odpowiednich modeli eksperymentalnych dla procesu angiogenezy ma kluczowe znaczenie dla lepszego zrozumienia mechanizmów molekularnych uruchamianych podczas wzrostu guza nowotworowego i tworzenia przerzutów. Zwraca również uwagę na to, że najczęściej używany do badania angiogenezy nowotworowej model śródbłonka, jakim jest linia komórkowa HUVEC wyprowadzona z komórek śródbłonka żyły pępowinowej, w żaden sposób nie odzwierciedla specyfiki ECs znajdujących się w mikrośrodowisku nowotworowym. Mowa tutaj zarówno o heterogenności i organospecyficzności ECs, jak również o wpływie TME na funkcje ECs. W dalszej części wstępu Autorka wprowadza w zagadnienie angiogenezy nowotworowej i biologii ECs. W sekcji Wyniki przedstawione zostały dane wskazujące wpływ TME na morfologię, proliferację, fenotyp oraz poziom ekspresji białka p53 i BCL6. Doktorantka wykazała, że ECs izolowane ze zdrowej tkanki charakteryzują się wyższym w porównaniu z ECs z tkanki nowotworowej współczynnikiem proliferacyjnym oraz ekspresją typowych dla śródbłonnków antygenów powierzchniowych. Dodatkowo zaobserwowano, że ECs pochodzące z guza nowotworowego charakteryzują się zwiększoną zdolnością do produkcji VEGF oraz zmniejszoną wydajnością w tworzeniu pseudonaczyń i niższą ekspresją cząsteczki FLK1 w porównaniu do ECs ze zdrowej tkanki. Ciekawych wyników dostarczyła również analiza transkryptomu, która ujawniła znaczne różnice w ekspresji genów pomiędzy zdrowymi i patologicznymi ECs. Doktorantka wykazała, że geny, których ekspresja w patologicznych ECs ulega największym zmianom odgrywają również ważne funkcje w komórkach nowotworowych. Dyskusja została przeprowadzona w sposób prawidłowy z odniesieniem do adekwatnych pozycji piśmiennictwa. Materiały i metody zostały przedstawione w sposób czytelny z uwzględnieniem wszystkich ważnych informacji niezbędnych do powtórzenia przeprowadzonych w niniejszej pracy doświadczeń. Podsumowując, praca zawiera wyniki badań, pozwalające na stwierdzenie użyteczności badanego modelu ECs w badaniach nad angiogenezą w raku piersi. Doktorantka wykazała, że linia ECs pochodzenia nowotworowego, pomimo procesu unieśmiertelniania i wielokrotnych pasażów zachowała cechy dysfunkcji w zakresie przepuszczalności i odpowiedzi proangiogennej oraz cech charakterystycznych dla mikrośrodowiska nowotworowego. Opisane linie z pewnością posłużą jako cenny model w opracowaniu nowych, bardziej skutecznych terapii przeciwingiennych w raku piersi.

Po lekturze tej pracy nasuwają się jednak dodatkowe pytania:

Czy analiza transkryptomu ujawniła zmiany w ekspresji genów charakterystycznych dla śródbłonka?

Jak uzyskane wyniki dotyczące ekspresji genów charakterystycznych dla komórek nowotworowych korelują z obrazem klinicznym pacjentki, od której wyizolowano śródbłónki?

Na końcu rozprawy doktorskiej Doktorantka zamieściła abstrakty dwóch kolejnych prac, które są obecnie w przygotowaniu. Prowadzone prace są kontynuacją badań realizowanych w trakcie studiów doktorskich i dotyczą określenia mechanizmu odpowiedzialnego za regulację procesu EMT w patologicznych ECs izolowanych z raka piersi oraz mechanizmu kontrolującego patologiczną angiogenezę. Niemniej jednak, wyniki te nie zostały zaprezentowane i nie wchodzą w zakres omawianej rozprawy doktorskiej.

Przedłożoną do oceny rozprawę doktorską oceniam wysoko. Jest to kompleksowe opracowanie, które może wpłynąć na zwiększenie efektywności prac prowadzonych w zakresie poszukiwania nowych, jakże potrzebnych, protokołów leczenia w onkologii. Dodatkowo, sposób przedstawienia zebranych informacji oraz uzyskanych wyników świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki, jej zdolnościach do wyznaczania celów badawczych i ich umiejętnego rozwiązywania. Obiektywnym potwierdzeniem wartości tej rozprawy jest również opublikowanie rezultatów pracy Doktorantki w czasopiśmie o łącznym współczynniku oddziaływania IF 12,416.

Biorąc powyższe pod uwagę, z przyjemnością stwierdzam, że przedłożona do oceny dysertacja spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z artykułami 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Kingi Wilkus-Adamczyk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

dr hab. Joanna Rossowska
Joanna Rossowska
Kierownik Międzyzakładowej Pracowni
Cytometrii i Mikroskopii Konfokalnej ITD PAN