

Akceptuję
H. J.

Kraków, 5 września 2023

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ Pani mgr. Kingi Wilkus-Adamczyk
p.t. "The influence of tumor microenvironment on the activity and gene expression profile of organospecific endothelial cells" wykonanej w Laboratorium Onkologii Molekularnej i Terapii Innowacyjnych Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie pod promotorską opieką Pani Prof. Claudine Kieda

Patomechanizm rozwoju choroby nowotworowej, obejmuje interakcje komórek nowotworowych ze śródbłonkiem naczyniowym, w czasie ich intrawazacji i extrawazacji, które mają kluczową rolę w rozwoju pierwotnego guza nowotworowego oraz rozwoju przerzutowości nowotworowej. Dysfunkcja śródbłonka systemowa ma również znacznie w rozwoju powikłań sercowo-naczyniowych u pacjentów onkologicznych. W szczególności istnieje szeroka literatura przedmiotu wskazująca na to że komórki śródbłonka guza pierwotnego (Tumour Endothelial Cells – TEC) mają zmienioną strukturę i funkcje, w tym zwiększoną przepuszczalność oraz wykazują szereg innych zmian strukturalnych, molekularnych i czynnościowych, które mają istotne znaczenie w rozwoju pierwotnego guza nowotworowego. Co warto podkreślić, w ostatnich latach nastąpiła zmiana w podejściu terapeutycznym do naczyń krwionośnych guza pierwotnego. Zamiast hamowania angiogenezy i głodzenia guzów z ich dopływu krwi, jak początkowo zaproponował Folkman w latach 70-tych, co później zostało zreszłą zaadaptowane w terapii embolizacji naczyń nowotworowych, podejmują się różnorodne próby podejść terapeutycznych normalizacji śródbłonka guza, mające na celu ustanowienie dojrzałych i funkcjonalnych naczyń krwionośnych guza, a w konsekwencji zwiększenie perfuzji guza i zmniejszenie niedotlenienia guza. Oczekuje się również, że normalizacja naczyń krwionośnych guza poprawi skuteczność chemioterapii i radioterapii, ograniczy intrawaskulację komórek nowotworowych, a także wyeliminuje anergię śródbłonka guza i immunosupresyjne jego mikrośrodowisko. W tym kontekście, szczególnie istotne jest aby lepiej zcharakteryzować komórki śródbłonka guza pierwotnego i lepiej zrozumieć odmienności fenotypu tego typu śródbłonka od prawidłowego śródbłonka w innych lokalizacjach.

Praca doktorska Pani mgr Kingi Wilkus pt.: *"The influence of tumor microenvironment on the activity and gene expression profile of organospecific endothelial cells"* wykonana pod promotorską opieką Pani Profesor Claudine Kieda wykonana w Laboratorium Onkologii Molekularnej i Terapii Innowacyjnych Wojskowego Instytutu

Medycznego w Warszawie dotyczy tego właśnie ważnego zagadnienia. Jej celem było scharakteryzowanie organospecyficzności komórek śródbłonka wynikającej z mikrośrodowiska guza, poprzez scharakteryzowanie globalnego wzoru ekspresji genów oraz fenotypu komórek śródbłonka pochodzących z guza pierwotnego, w porównaniu ze zdrowym śródbłonkiem. Badanie przeprowadzono na wyizolowanych i unieśmiertnionych komórkach śródbłonka pochodzących z guza pierwotnego raka piersi oraz z sąsiadującej zdrowej tkanki od tej samej pacjentki, z wykorzystaniem nowoczesnej metodologii NGS, innych podstawowych metod biologii komórki, oraz testów funkcjonalnych śródbłonka.

Wyniki pracy doktorskiej zostały opublikowane w jednej pracy oryginalnej opublikowanej w 2022, w których pierwszym autorem jest doktorantka, opublikowanej w czasopiśmie *Int. J Molecular Sciences* (wydawnictwo MDPI), jednak rozprawa doktorska obejmuje też drugą pracę pogładową opublikowaną rok wcześniej w tym samym czasopiśmie, w którym doktorantka jest pierwszym autorem, ale dzieli pierwsze autorstwo z Panią Aleksandrą Majewską. Poza kopiami obydwóch prac, oświadczeniami współautorów, praca doktorska obejmuje: 2-3 stronicowe streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, 2 stronicowy wstęp z jedną ryciną i kilkunastoma pozycjami piśmiennictwa, pół-stronicowy cel pracy w języku angielskim, krótką konkluzję pracy w języku angielskim, oraz dwa abstrakty prac w przygotowaniu, których doktorantka jest pierwszym autorem. Jedna z tych prac ukazała się już we *Frontiers Front Cell Dev Biol.* 2023, doi: 10.3389/fcell.2023.1125077. eCollection 2023, Kinga Wilkus-Adamczyk et al.), ale jej ciekawe wyniki nie są ujęte w rozprawie doktorskiej, a szkoda, że ich nie ujęto w formie wyników nieopublikowanych, bezsprzecznie wzbogaciły by wyniki niniejszej rozprawy doktorskiej.

W sumie więc forma doktoratu, jest bardzo zwięzła, powiedziałbym telegraficzna, recenzent nie ma więc szansy na ocenę samodzielnej pracy myślowej doktorantki, której owoc mógłby się znaleźć w bardziej rozbudowanym omówieniu rozprawy doktorskiej – innym, niż to znajdujące się w opublikowanych pracach. Mogłoby ono lepiej zarysowując zagadnienie badawcze, które było przedmiotem badań, omawiać szerzej uzyskane wyniki w kontekście istniejącej wiedzy i omówić perspektywy wynikające z uzyskanych wyników. Przyznam, że pierwszy raz oceniam, tak skrotowo napisaną rozprawę doktorską, i choć formalnie nic jej nie brakuje, odczuwam spory niedosyt.

Tym bardziej, że w sumie uzyskano bardzo ciekawe wyniki, pokazujące profil molekularny i funkcjonalny TEC: wykazano obniżoną ekspresję w TEC, szeregu markerów takich jak ACE, vWF, CD31, CD133, Cd105, CD34, ICAM-1, VCAM-1, CD62L, ZO-1 oraz zmiany w ekspresji dwóch regulatorów apoptozy p53 i BCL6. Wykazano zwiększone

uwalnienie VEGF-A, przez hipoksję w komórkach TEC w porównaniu do komórek prawidłowego śródbłonka, obniżoną zdolność angiogenną, obniżoną zdolność proliferacji, (stwierdzono również zmiany w zdolności migracji komórek, ale ich nie umieszczono w pracy, jako nieopublikowane wyniki, jednak o nich wspomniano w streszczeniu pracy). Nie zauważyłem jednak wyników analizy przepuszczalności na żadnej z 5 rycin opublikowanej pracy, choć w metodyce pracy metoda badania przepuszczalności została umieszczona? Na poziomie molekularnym wykazano zmianę szeregu genów przebudowy macierzy pozakomórkowej i genów sugerujących procesy przejścia śródbłonkowo-mezenchymalnego (endoMT), choć zmiany alfa-SMA nie były znamienne. Z ok. 300 genów zmienionych w NGS, wybijała się obniżona ekspresja PECAM-1 i podwyższona Ephriny-B2. Ciekawym był szerszej dyskusji omówionych wyników na obronie i krytycznej ich analizie, oraz odpowiedzi na szereg nasuwających się pytań.

Czy przeprowadzono badania bardziej zaawansowane opisujące zmiany ultrastruktury uzyskanych TEM ? Czego można by się spodziewać w kontekście tego co opisywano wcześniej ? (*A.C. Dudley, Tumor endothelial cells., Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2 (2012) a006536. doi:10.1101/cshperspect.a006536*). Które z opisanych zmian w NGS, najbardziej odpowiadają ze funkcjonalne zmiany opisane w pracy ? Opis zmian na poziomie molekularnym i czynnościowym nie są dobrze połączone. Które z uzyskanych wyników mogą świadczyć o tym, że uzyskane TEM mają bardziej pierwotny niezrozniczony charakter ? (*B. Bussolati et al., Exp. Cell Res. 312 (2006) 913–24. doi:10.1016/j.yexcr.2005.12.004*).

Istotnym elementem fenotypu TEM, jest zwiększona przepuszczalność śródbłonka i upośledzenie bariery komórkowej. Opisywano również upośledzenie blony podstawy komórek TEM, wręcz obecność fenestracji w TEM. Opisywano też, że prozapalny fenotyp TEM stymuluje odpowiedź zapalną i migrację komórek nowotworowych (*Joseph W Franses et al, Int. J. Cancer. 133 (2013) 1334–44*). Tymczasem w przedstawionej pracy opisano spadek molekuł adhezyjnych w TEM i wzrost ekspresji genów związanych z przebudową macierzy pozakomórkowej. Jak wytłumaczyć rysujące się rozbieżności ? Jaka funkcjonalną rolę miałyby mieć więc syntetyzowane białka macierzy pozakomórkowej ?

W wielu pracach opisywano, że TEC uwalniają czynniki angiokrynne, które mogą znacząco wpływać na fenotyp komórek nowotworowych (*D.Klain, Front. Oncol. 8 (2018). doi:10.3389/fonc.2018.00367; J.W. Franses & E.R. Edelman, Cancer Res. 71 (2011) 7339–44. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1718*). Jak odnieść opisane w rozprawie doktorskiej zmiany genotypu i fenotypu TEC w ten opisywany w literaturze paradygmat ?

W kontekście wyników tej rozprawy doktorskiej, nasuwa się również pytanie, czy może być tak, że fenotyp unieśmiertnionych komórek TEC utrzymywany w hodowli *in vitro*, choć wykazuje istotne zmiany w stosunku do komórek zdrowego śródbłonka jest odmienny od tego, który występuje w guzie pierwotnym *in vivo*? Po pierwsze dlaczego wykorzystano tylko komórki od jednej pacjentki? Po drugie, czy mogą mieć znaczenie czynniki epigenetyczne w regulacji fenotypu TEC? (*Cancer Res.* 66 (2006) 10770–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1609). Po trzecie, czy sposób unieśmiertnienia komórek śródbłonka może mieć znaczenie dla ich fenotypu? Na jakiej podstawie wybrano/opracowano ten który zastosowano w tej pracy? Po czwarte, czy mogą mieć znaczenie czynniki parakryne z innych komórek oddziaływujące na komórki TEC, odpowiedzialne z ich fenotyp *in vivo*? Dla przykładu wykazano, że brak płytek krwi zwiększa krwawienia w guzie pierwotnym (*B. Ho-Tin-Noé, et al., J. Thromb. Haemost.* 9 Suppl 1 (2011) 56–65. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04317.x. *B. Ho-Tin-Noé et al., Am. J. Pathol.* 175 (2009) 1699–708. doi:10.2353/ajpath.2009.090460.) Obecność płytek krwi może więc być kluczowa dla utrzymania fenotypu TECs *in vivo*. Ponadto, w warunkach *in vivo*, dysfunkcja śródbłonka TEC, może być również związana z postawianiem zjawiska vascular mimicry (VM) przez komórki nowotworowe (*H. Ge, H. Luo, Cancer Manag. Res.* (2018) .doi:10.2147/CMAR.S164675) i bez obecności komórek nowotworowych trudno takie zjawiska badać.

W końcu, ciekaw jestem czy zdaniem doktorantki uzyskane wyniki wskazują na jakieś nowe cele terapeutyczne, które warto by w kontekście normalizacji czynności TEC rozważyć? Poza tymi, które ostatnio pojawiają się w literaturze. Przy okazji, ciekaw jestem, które z nich doktorantka uważa za najbardziej obiecujące i dlaczego?

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani lek.med mgr. Kingi Wilkus-Adamczyk pt.: „*The influence of tumor microenvironment on the activity and gene expression profile of organospecific endothelial cells*” pomimo uwag krytycznych o których mowa powyżej - a dotyczą one głównie bardzo ubogiego omówienia uzyskanych wyników i zupełnego braku szerszej perspektywy dla poruszanych zagadnień- uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Wilkus-Adamczyk spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Zawiera również merytorycznie ciekawe wyniki, choć zabrakło w nich wyników nieopublikowanych, o których jest mowa w rozprawie. Nie mówiąc już o wynikach dodatkowych, które ukazały się w ostatnio opublikowanej pracy, których dodanie w formie wyników nieopublikowanych znacznie wzbogaciły by rozprawę doktorską.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Wnoszę o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Stefan Chłopicki