

Prof. zw. dr hab. med. Jacek Wachowiak
Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatrycznej
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
ul. Szpitalna 27/33
60-572 Poznań

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Balik pt.:

„Mikrośrodowisko nowotworowe jako cel terapii personalizowanej”

Zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy z dnia 27 września 2023 r. o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Balik pt. „Mikrośrodowisko nowotworowe jako cel terapii personalizowanej” mam niniejszym zaszczyt przedstawić następującą opinię.

Według Krajowego Rejestru Nowotworów obecnie każdego roku na nowotwór zachorowuje aż ok. 170 tys. Polaków, a ok. 100 tys. umiera z powodu choroby nowotworowej i tym samym nowotwory są przyczyną aż ponad 25% zgonów w Polsce. Co gorsza szacuje się, że w Polsce i na świecie liczba zachorowań na nowotwory będzie systematycznie i dynamicznie wzrastać. Z przytoczonych danych epidemiologicznych wynika zatem, że choroby nowotworowe są jednym na najpoważniejszych problemów społecznych i najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny i to pomimo dotychczasowych, znacznych postępów onkologii, które jednak okazują się wciąż niewystarczające. Stąd potrzeba dalszych badań służących dokładnemu poznaniu zróżnicowanej biologii chorób nowotworowych, której znajomość jest niezbędne do dalszej optymalizacji leczenia poprzez jego personalizację umożliwiającą na coraz szerszą skalę zastosowania terapii ukierunkowanej na zidentyfikowane cele biologiczne. Obecnie coraz więcej wskazuje na to, że obiektem terapii ukierunkowanej, poza defektami molekularnymi i markerami immunologicznymi charakteryzującymi dany nowotwór, może i powinno być również mikrośrodowisko nowotworu w interakcji, z którym nowotwór się rozwija. W populacji osób dorosłych najczęstszymi nowotworami są raki, tj. nowotwory wywodzące się z tkanki nabłonkowej. Z kolei wśród raków do jednych

z najczęstszych należą rak prostaty oraz rak pęcherza moczowego, które pomimo stosowanego obecnie leczenia prowadzą do zgonu u ok. 40% chorych.

Stąd uważam, że podjęcie przez Panią mgr Karolinę Balik jako tematu rozprawy doktorskiej badań mikrośrodowiska nowotworowego jako celu terapii personalizowanej należy uznać za ważne, potrzebne i w pełni uzasadnione.

Praca przedstawiona do oceny liczy 107 stron i składa się ze spisu treści, wykazu skrótów, streszczenia w języku polski i angielskim, wstępu, celu pracy, opisu badanego materiału i zastosowanych metod badań, omówienia wyników badań, dyskusji, wniosków, wykazu 4 tabel i 36 rycin oraz spisu 117 pozycji cytowanego w pracy piśmiennictwa, spośród których 84 prace (72%) opublikowane zostały w ciągu ostatnich 5 lat.

We „Wstępie” do rozprawy przedstawione zostały najpierw aktualne dane epidemiologiczne dotyczące zachorowań na nowotwory w Polsce i na świecie ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów układu moczowo-płciowego, w tym zachorowań na raka prostaty i raka pęcherza moczowego, które w populacji osób dorosłych należą do najczęściej rozpoznawanych nowotworów. Przedstawione dane wskazują jednoznacznie na potrzebę dalszych badań podstawowych i klinicznych w onkologii, w tym badań dotyczących biologii nowotworów, identyfikacji nowych czynników rokowniczych oraz identyfikacji nowych celów terapii ukierunkowanej.

W drugiej części „Wstępu” w oparciu o najnowsze piśmiennictwo omówiony został aktualny stan wiedzy dotyczącej wpływu mikrośrodowiska guza na rozwój nowotworu, w tym biologii i mechanizmów oddziaływania na nowotwór najważniejszych komórkowych składowych mikrośrodowiska guza, a mianowicie mezenchymalnych komórek macierzystych oraz trzech podtypów fibroblastów związanych z rakiem.

W kolejnej części „Wstępu” omówiono zidentyfikowane już przesłanki przemawiające za możliwością potraktowania mikrośrodowiska guza jako celu ukierunkowanej terapii personalizowanej, ale jednocześnie zwrócono uwagę na heterogenność i niestabilność mikrośrodowiska guza, jako przeszkody, która może utrudniać wykorzystanie tego środowiska jako jednego z celów w leczeniu choroby nowotworowej.

W ostatniej części „Wstępu” zwięźle omówiono przydatność i ograniczenia badań *in vitro* w badaniach podstawowych, w tym dotyczących komórek nowotworowych, szczególnie w badaniach interakcji między różnymi typami komórek

obecnych w mikrośrodowisku guza oraz w trakcie oceny cytotoksyczności wybranych chemioterapeutyków.

Na tle przedstawionego we „Wstępie” aktualnego stanu wiedzy dotyczącej mikrośrodowiska guza i jego składowych sformułowany został cel rozprawy doktorskiej, a mianowicie analiza parakrynnego wpływu fibroblastów związanych z rakiem na komórki raka prostaty i raka pęcherza moczowego, w tym na ich żywotność, aktywność proliferacyjną, apoptozę i skład sekretomu oraz na wrażliwość badanych komórek na cisplatynę i ciprofloksacynę, a także analiza parakrynnego wpływu mezenchymalnych komórek macierzystych na wrażliwość badanych komórek na w/w chemioterapeutyki.

Materiał do badań stanowiły linie komórek raka pęcherza moczowego HB-CLS-1 oraz raka prostaty DU 145, które hodowano w medium RPMI 1640 z suplementacją płodowej surowicy bydlęcej. Jako reprezentację mikrośrodowiska guza stosowano unieśmiertelnione mesenchymalne komórki macierzyste ACSCTelo pochodzące z tkanki tłuszczowej oraz fibroblasty związane z rakiem prostaty HC-623, których hodowlę wykorzystywano jako źródło medium kondycjonowanego, zawierającego metabolity, czynniki wzrostu, cytokiny i chemokiny uwalniane do medium hodowlanego przez w/w komórki reprezentujące mikrośrodowisko guza. Zmiany w panelu cytokin i chemokin uwalnianych przez badane komórki nowotworowe zachodzące w wyniku interakcji pomiędzy badanymi komórkami a bioaktywnymi mediatorami znajdującymi się w medium kondycjonowanym oceniano z wykorzystaniem komercyjnych testów ELISA. Żywotność komórek raka pęcherza moczowego i raka prostaty inkubowanych w medium kondycjonowanym oceniano przy użyciu testu MTT. Do oceny aktywności proliferacyjnej wymienionych komórek nowotworowych stosowano test z bromodeodeoxyurydyną (BrdU). Oceny apoptozy komórek nowotworowych dokonywano z użyciem barwienia CellEvast Caspase-3/7 Green, a aktywację wybranych szlaków sygnalizacyjnych, tj. ścieżki kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MAPK) oraz szlaku PI3K/AKT/mTOR, oceniano z zastosowaniem testu Activation InstantOne ELISA. Oceny ekspresji białka całkowitego p53 oraz jego ufosforylowanej formy dokonywano przy użyciu testu p53 (Total/Phospho) Multispecies InstantOne ELISA.

Przeprowadzono również badania zmian wrażliwości komórek raka prostaty i komórek raka pęcherza moczowego na cisplatynę i ciproflaksynę zachodzących pod wpływem kondycjonowanego medium z hodowli fibroblastów związanych z

rakiem, IL-33 i czynnika wzrostu fibroblastów 2 oraz kondycjonowanego medium z hodowli mesenchymalnych komórek macierzystych ASCStelo. W celu oceny wpływu wymienionych czynników na wrażliwość badanych komórek nowotworowych na wymienione chemioterapeutyki oceniano żywotność tych komórek z użyciem testu MTT oraz aktywność proliferacyjną z użyciem testu BrdU.

Omówienie zastosowanych metod badań laboratoryjnych jest szczegółowe i świadczy o ich bardzo dobrej znajomości oraz uzasadnia ich wybór w odniesieniu do założonego celu pracy. Do oceny uzyskanych wyników badań zastosowano odpowiednie metody analizy statystycznej.

Zgody na przeprowadzenie badań udzieliła Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy na posiedzeniach w dniach 29.10.2019 r. (uchwała nr KB 766/2019) i 15.06.2021 r. (uchwała nr KB 402/2021).

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że zarówno inkubacja komórek raka pęcherza, jak i komórek raka prostaty z medium kondycjonowanym uzyskanym z hodowli fibroblastów związanych z rakiem spowodowała zmianę aktywności sekrecyjnej komórek nowotworowych wyrażoną zmianą profilu syntetyzowanych i uwalnianych przez nie cytokin i chemokin, a także wzrost ich żywotności mierzonej przy użyciu testu MTT oraz wzrost aktywności proliferacyjnej badanych komórek nowotworowych mierzonej z zastosowaniem testu BrdU. Oceniając za pomocą barwienia CellEvast Caspase-3/7 Green wpływ cząsteczek bioaktywnych obecnych w medium z hodowli fibroblastów związanych z rakiem na apoptozę badanych komórek nowotworowych zaobserwowano obniżenie się odsetka komórek apoptotycznych, ale było ono istotne statystycznie tylko w odniesieniu do komórek raka pęcherza moczowego po 48 godzinach inkubacji z w/w medium. Badano również wpływ medium kondycjonowanego i tym samym zawartych nim cząsteczek uwalnianych przez fibroblasty związane z rakiem na wybrane szlaki sygnalizacyjne w badanych komórkach nowotworowych i stwierdzono, że po inkubacji z w/w medium zarówno w komórkach raka pęcherza moczowego, jak i w komórkach raka prostaty dochodzi do wzrostu ekspresji kinazy ERK 1/2 będącej główną kinazą szlaku MAPK-ERK 1/2 oraz wzrostu aktywności kinazy AKT 1/2 stanowiącej część szlaku sygnalizacyjnego PI3K/AKT/mTOR. Ponadto przeprowadzono analizę zmian ekspresji całkowitego białka p53 i jego aktywnej formy Ser15 w badanych komórkach nowotworowych inkubowanych z medium kondycjonowanym, która w przypadku

komórek raka pęcherza moczowego wykazała istotny wzrost ekspresji białka p53 przy jednoczesnym znaczącym statystycznie obniżeniu ekspresji jego aktywnej formy, natomiast w przypadku komórek raka prostaty obserwowano obniżenie ekspresji białka całkowitego oraz ekspresji aktywnej formy białka p53.

Aby ocenić czy substancje uwalniane do medium hodowlanego przez fibroblasty związane z rakiem wpływają na wrażliwość badanych komórek nowotworowych na działanie chemioterapeutyków oceniano żywotność i aktywność proliferacyjną komórek raka pęcherza po inkubacji z medium kondycjonowanym i ciprofloksacyna oraz komórek raka prostaty po inkubacji z medium kondycjonowanym i cisplatyną. W obu przypadkach stwierdzono wzrost żywotności i aktywności proliferacyjnej badanych komórek, a zatem ich mniejszą wrażliwość na zastosowane chemioterapeutyki w obecności medium kondycjonowanego. Przeciwnie, blokowanie FGF w medium kondycjonowanym powodowało wzrost wrażliwości badanych komórek nowotworowych na chemioterapeutyki zastosowane w doświadczeniu. Podobny efekt w odniesieniu do komórek raka pęcherza obserwowano po wykluczeniu IL-33 z medium kondycjonowanego.

W badaniach dotyczących wpływu medium uzyskanego z hodowli mesenchymalnych komórek macierzystych na badane komórki nowotworowe, stwierdzono, że inkubacja z w/w medium powoduje wzrost żywotności i aktywności zarówno komórek raka pęcherza moczowego, jak i komórek raka prostaty. Przeprowadzono również badania wrażliwości badanych komórek nowotworowych inkubowanych z medium uzyskanym z hodowli macierzystych komórek mesenchymalnych na wybrane chemioterapeutyki, w których stwierdzono większą wrażliwość inkubowanych komórek raka pęcherza na ciprofloksacynę, natomiast mniejszą wrażliwość inkubowanych komórek raka prostaty na cisplatynę.

Omówienie wyników badań jest szczegółowe, a jednocześnie przejrzyste, także dzięki dobrze skonstruowanym i starannie wykonanym tabelom i rycinom ilustrującym rezultaty badań.

W „Dyskusji” z dużą wiedzą, umiejętnie i w bardzo interesujący sposób odniesiono wyniki badań własnych do wyników opublikowanych przez innych autorów zwracając przy tym uwagę na występujące różnice i podobieństwa i ich możliwe przyczyny. „Dyskusję” kończą uwagi, które wobec rozbieżności w opublikowanych wynikach i wciąż dalece niekompletnej wiedzy o mikrośrodkowisku guza i poszczególnych jego składowych, wskazują na potrzebę dalszych badań w

tym zakresie. W „Dyskusji” podkreślone zostały własne oryginalne spostrzeżenia, a sposób przeprowadzenia „Dyskusji” świadczy bardzo dobrej umiejętności przedstawiania wyników badań naukowych oraz myślenia naukowego, a co za tym idzie o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Na podstawie analizy wyników przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała cztery wnioski, które odpowiadają celom pracy i dokumentują ich realizację.

W trakcie oceny niniejszej rozprawy doktorskiej recenzentowi nie nasunęły się żadne istotne uwagi krytyczne dotyczące realizacji lub treści ocenianej rozprawy, a jedynie jedna uwaga natury redakcyjnej dotycząca „Wykazu skrótów”, który byłby łatwiejszy w użyciu, gdyby zamieszczone w nim skróty były uporządkowane w kolejności alfabetycznej.

Reasumując, rozprawę doktorską mgr Karoliny Balik oceniam bardzo wysoko. Stanowi ona oryginalne opracowanie zagadnienia, które ma duże znaczenie dla współczesnej onkologii, zarówno poznawcze w zakresie lepszego zrozumienia biologii nowotworów mających charakter guza łitego, jak i znaczenie kliniczne w zakresie identyfikacji nowych, potencjalnych celów dla ukierunkowanej, personalizowanej terapii chorób nowotworowych. Wyniki badań zostały prawidłowo i bardzo starannie opracowane. Omówienie wyników i dyskusja poparte są obszernym współczesnym piśmiennictwem, inspirują do dalszych badań i świadczą o znakomitym przygotowaniu Doktorantki do podjętego tematu badań. Wnioski znajdują odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach.

Stąd uważam, że rozprawa doktorska mgr Karoliny Balik spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy z wnioskiem o dopuszczenie mgr Karoliny Balik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wzięwszy pod uwagę nowatorski charakter podjętych badań, sposób ich realizacji i znaczenie wyników badań uzyskanych w trakcie realizacji rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie.

Poznań, 10 lutego 2024 r.



Prof. zw. dr hab. med. Jacek Wachowiak