



**Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk**

Prof. dr hab. nauk med. Leonora Bużańska,

Dyrektor

Zakład Bioinżynierii Komórek Macierzystych – Kierownik

Tel: (48 22) 608 64 49

e-mail: buzanska@imdik.pan.pl

Warszawa, 29.04.2020

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Agnieszki Świć
„Wykorzystanie analogów witaminy D oraz leków z grupy inhibitorów kinaz
tyrozynowych do eliminacji opornych na 5-fluorouracyl komórek raka jelita grubego
o charakterystyce nowotworowych komórek macierzystych”**

Teorie związane z rolą nowotworowych komórek macierzystych w powstawaniu nowotworów pierwotnych, a także inicjacją ich wznowy, są wciąż przedmiotem dyskusji naukowych i tematem licznych projektów badawczych. To właśnie komórki o charakterze komórek macierzystych mają zdolność do samoodnowy i w testach funkcjonalnych - tworzenia nowych klonów, co więcej są odporne na działanie leków cytotoksycznych i napromieniowanie, dlatego tak trudne do eliminacji podczas terapii antynowotworowej. Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Agnieszki Świć, wykonana pod opieką merytoryczną prof. Sergiusza Markowicza jest wynikiem prac doświadczalnych, których celem terapeutycznym są komórki raka jelita grubego o charakterystyce nowotworowych komórek macierzystych. Praca ta dotyczy oceny przydatności analogów witaminy D oraz inhibitorów receptorowych kinaz tyrozynowych: imatinibu i sunitinibu do wyciszenia lub eliminacji komórek raka jelita grubego przetrwałych po leczeniu konwencjonalnym lekiem cytotoksycznym i zdolnych do inicjowania wznowy nowotworu.

Recenzowana praca doktorska jest zbiorem czterech związanych tematycznie artykułów, opublikowanych w latach 2016 – 2019, w międzynarodowych czasopismach naukowych: „Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis”, Tumour Biology”, „International Journal of Molecular Sciences” oraz The Journal of Steroid Biochemistry

skład rozprawy”, „Podsumowanie i wnioski” oraz „Piśmiennictwo”. Wyodrębnione przez Doktorantkę cele pracy zawierały (cytuję):

1. Zbadanie zdolności leków z grupy niskcząsteczkowych inhibitorów receptorowych kinaz tyrozynowych (TKI) imatinibu i sunitinibu oraz analogów witamin 1,25D3 i 1,25D2 do hamowania odnowy komórek raka jelita grubego przetrwałych po ekspozycji na konwencjonalny lek cytotoksyczny.
2. Zbadanie czy i jak analogi witamin 1,25D3 i 1,25D2 oraz imatinib i sunitinib modyfikują ekspresję genów warunkujących utrzymanie cech macierzystości komórek raka jelita grubego w trakcie ich odnowy po cytoredukcji konwencjonalnym lekiem cytotoksycznym.

Doktorantka weryfikuje hipotezę badawczą, zakładającą że inhibitory receptorowych kinaz tyrozynowych imatinib i sunitinib, a także wybrane analogi Witaminy D skutecznie eliminują komórki o charakterze nowotworowych komórek macierzystych w drugim etapie dwustopniowej, sekwencyjnej terapii raka jelita grubego. Konwencjonalne leczenie przeciwnowotworowe w oparciu o eliminację komórek w fazie podziałowej cyklu komórkowego (leki cytotoksyczne lub napromieniowanie) nie przynosi oczekiwanych skutków terapeutycznych – pozostaje populacja komórek oporna na te działania, tzw. CSC/TIC (ang. *cancer stem cells/tumor initiating cells*). Doktorantka w rozdziale „Wprowadzenie” wyczerpująco wyjaśnia na czym polega zwiększenie tej oporności, wymieniając m.in. podwyższoną wydajność mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA, nadekspresję białek transporterowych związanych z lekoopornością oraz białek antyapoptotycznych, wysoką aktywność enzymu dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) oraz pobudzenie ścieżek sygnałowych, takich jak NOTCH i NF- κ B, które są związane z przeżyciem, jak również tych, które warunkują zdolność komórek do samoodtwarzania: EGF, SCF, PDGF, VEGF, SHH i/lub WNT/ β -katenina.

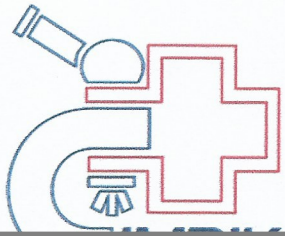
Wyboru czynników skierowanych przeciwko komórkom nowotworowym przetrwałym po cytoredukcji w dwustopniowej strategii terapeutycznej sekwencyjnego leczenia raka jelita grubego, Doktorantka dokonała w oparciu o dane literaturowe i wcześniejsze badania Zespołu, w wyniku których zsyntetyzowano analogi witaminy D, które zostały zastosowane w tej rozprawie. Dane literaturowe wskazują na korelację niedoborów witaminy D z wyższym ryzykiem wzrostu gruczolaków jelita grubego i jej udział w zapobieganiu zachorowania na raka jelita grubego. Dodatkowo badania *in vitro* na ludzkich komórkach HT-29 raka jelita grubego z zastosowaniem witaminy D i leku cytotoksycznego wskazywały na synergiczne działanie tych dwóch substancji w eliminowaniu komórek nowotworowych. Wiadomo również, że biologicznie aktywny metabolit witaminy D3, kalcytriol ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), w wysokich dawkach koniecznych do uzyskania efektu przeciwnowotworowego wywołuje hiperkalcemiczne skutki uboczne, dlatego wybór do eksperymentów przeprowadzonych w tej pracy hipokalcemicznych analogów witaminy D: $1\alpha,25$ -dihydroksywitaminy D2 ($1,25\text{D}_2$) i $1\alpha,25$ -dihydroksywitaminy D3 ($1,25\text{D}_3$) był uzasadniony.

Drugim typem leków z wyboru, zastosowanych w tej rozprawie są inhibitory receptorowych kinaz tyrozynowych: Imatinib i Sunitinib, stosowane w leczeniu białaczki szpikowej i limfoblastycznej oraz raka nerki. Mechanizm działania imatinibu dotyczy hamowania receptorów czynnika komórek pnia (c-KIT), czy też receptorów α i

β płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR α , PDGFR β). Sunitinib dodatkowo hamuje receptory czynników wzrostu śródbłonna naczyń (VEGFR1, VEGFR2 i VEGFR3) i receptor kinazy tyrozynowej podobnej do Fms-3 (FLT3). W efekcie działanie tych leków hamuje drogi przekazywania sygnału związane z proliferacją oraz przeżyciem komórek nowotworowych o cechach progenitorowych, w których występuje nadekspresja wyżej wymienionych czynników. Badania *in vitro* wskazujące że imatinib działa hamująco na wzrost komórek raka jelita grubego i odbytnicy, a także wykazane bezpieczeństwo stosowania tego leku w przeprowadzonej próbie klinicznej I/II stopnia w kombinowanym zastosowaniu z lekami cytotoksycznymi uzasadnia wybór przez Doktorantkę właśnie tego leku do dalszych badań. Zastosowanie sunitinibu w próbach klinicznych leczenia raka jelita w kombinacji z konwencjonalnymi lekami cytotoksycznymi łączyło się z licznymi zdarzeniami niepożądanymi, dlatego włączenie tego leku do badań Doktorantki, które w pierwszym momencie budzi zdziwienie, należy pewnie tłumaczyć ciekawością badawczą i poszukiwaniem mechanizmów molekularnych takiej odpowiedzi, co jest zgodne z drugim celem recenzowanej pracy.

W pierwszej publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej: „Imatinib Inhibits the Renewal and Tumorigenicity of CT-26 Colon Cancer Cells after Cytoreductive Treatment with Doxorubicin” Doktorantka w eksperymencie badawczym przeprowadzonym *in vitro* oraz *in vivo* przedstawiła na modelu mysim schemat dwustopniowej terapii z sekwencyjnym zastosowaniem leku cytotoksycznego doksorubicyny (DOX), a następnie imatinibu: leku skierowanego przeciwko komórkom o fenotypie macierzystym. Materiałem była mysia linia komórek raka jelita CT-26, syngeniczna dla myszy szczepu BALB/c o potwierdzonej ekspresji receptorów PDGFRA i PDGFRB, z którymi łączy się inhibitor receptorów kinaz tyrozynowych - imatinib. Badania *in vitro* przeprowadzano w dwóch różnych warunkach tlenowych, które doktorantka określa jako „normoksja” (środowisko tlenu atmosferycznego) i „hipoksja” (5% CO₂). W tym miejscu mam pewną uwagę, która nie jest zarzutem, lecz powodem do dyskusji na temat stosowanej nomenklatury związanej z poziomem tlenu w zdrowych i nowotworowych tkankach organizmu, gdzie występują nisze komórek macierzystych, jak również w hodowli komórkowej *in vitro*. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, jak rozumie pojęcia „normoksja”, „normoksja fizjologiczna”, „hipoksja” i „hipoksja umiarkowana” w zastosowaniu do takich warunków.

Otrzymane wyniki potwierdziły skuteczność imatinibu w hamowaniu proliferacji i klonogenności komórek CT-26 preselekcjonowanych DOX (CT-26/DOX) w warunkach tlenu atmosferycznego i 5% O₂ *in vitro*. Podobne wyniki otrzymano w modelu *in vivo* z przeszczepami podskórnymi komórek CT-26 do syngenicznego szczepu myszy BALB/c: imatinib opóźniał powstawanie i wzrost guzów u 50% myszy i zapobiegał ich powstawaniu u pozostałych 50%, natomiast nie przeciwdziałał formowaniu guzów po podaniu komórek chemionaiwnych. Wnikliwa analiza molekularna komórek CT-26 na poszczególnych etapach sekwencyjnej ekspozycji na



jedynie między niepodaniem myszom imanitibu, a wzrostem w nowotworach liczby komórek Ki67 pozytywnych (tj. komórek podziałowych) oraz tzw. „pączkowaniem”

inhibitorów kinaz tyrozynowych i analogów Witaminy D w przeciwdziałaniu wznowie raka jelita grubego po działaniu cytostatyków.

W tej pracy sekwencyjnemu traktowaniu lekami z grupy inhibitorów kinaz tyrozynowych i analogów witaminy D poddane są ludzkie komórki raka jelita grubego po ekspozycji na 5-FU *in vitro* (HT-29/5-FU lub HCT-116/5-FU) w różnych warunkach tlenowych: 20% O₂ oraz 5% O₂. W warunkach tlenu atmosferycznego po cytoredukcji komórek nowotworowych, ekspresja genów typowych dla macierzystości uległa znacznemu podwyższeniu i utrzymywała się na wysokim poziomie, podczas gdy hodowla w warunkach obniżonego poziomu tlenu spowodowała spontaniczny spadek ekspresji tych genów. To wydaje się być sprzeczne z faktem, że warunki obniżonego poziomu tlenu sprzyjały tworzeniu się kolonii komórek zarówno w linii HT-29/5-FU jak i HCT-116/5-FU. W tym miejscu poprosiłabym Doktorantkę o komentarz, ponieważ zarówno w „Podsumowaniu i wnioskach” tej rozprawy, a nawet w dyskusji już opublikowanej pracy nie znalazłam odniesienia do wyników hodowli i traktowania wybranymi lekami badanych komórek w obniżonym poziomie tlenu.

Z zaprezentowanych wyników można wywnioskować, że imatinib działał podobnie w obydwu warunkach tlenowych powodując hamowanie proliferacji (znakowanie KI67) oraz migracji (test zarastania rysy) komórek HT-29/5-FU, ale co jest moim zdaniem istotne, to wynik, że imatinib i sunitinib znosiły promujący efekt „hipoksji” na klonogenność komórek raka jelita grubego przetrwałych po ekspozycji na 5-FU. Sugeruje to efektywność tych leków w warunkach hipoksji mikrośrodowiska typowego dla endogennej tkanki nowotworowej.

Doktorantka porównując w tej pracy działanie dwóch inhibitorów receptorów kinaz tyrozynowych imatinibu i sunitinibu wskazuje na imatinib jako potencjalny lek z wyboru do zapobiegania wznowie raka jelita grubego. Imatinib hamował odnowę ludzkich komórek raka jelita grubego po ekspozycji na 5-FU i obniżył ekspresję genów związanych z macierzystością w obu testowanych liniach raka jelita grubego. Sunitinib, pomimo tego, że hamuje tworzenie kolonii przez komórki linii HT-29 o umiarkowanym stopniu zróżnicowania w trakcie ich odnowy po ekspozycji na 5-FU, wywołuje jednocześnie wzrost poziomu ekspresji genów związanych z macierzystością, tak więc zwiększa ryzyko wznowy nowotworu.

Następnym, bardzo istotnym wynikiem tej pracy jest wykazanie, że imatinib oraz analog witaminy D3 PRI-2191, podane jednocześnie działają synergistycznie, wzmacniając efekt antynowotworowy wywołany przez każdy z tych leków osobno, tj. z jeszcze większą znamiennością statystyczną hamując proliferację oraz ekspresję genów typowych dla macierzystości w komórkach obydwu badanych linii HT-29/5-FU i HCT-116/5-FU. Można więc wysnuć wniosek, że połączone działanie tych dwóch leków skuteczniej będzie zapobiegać wznowie nowotworu po konwencjonalnej chemioterapii niż sam imatinib. Wartością dodaną takiej terapii może być również kompensacja niedoboru aktywnej formy witaminy D wywołowany przez imatinib, który działa jako kompetencyjny ligand w szlaku metabolicznym witaminy D.

Zróżnicowanie stosowanych metod badawczych, którymi posługiwała się Doktorantka we wszystkich zaprezentowanych pracach, świadczy o Jej dojrzałości jako eksperymentatora. W doświadczeniach prowadzonych *in vitro*, m.in. fenotypowania komórek i określenia ich stadium zaawansowania rozwojowego/macierzystości

stosowano metody cytometrii przepływowej, sortowania magnetycznego oraz analizę ekspresji genów metodą qRT-PCR. Według mojej oceny, panele badanych genów macierzystości (m.in. *PROM1*, *ALDH1* i *CXCR4*, *NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*, *LGR5* i *SHH*), czy też angiogenezy i inwazyjności (m.in. *HIF1A*, *HIF2A*, *MTOR*, *VEGFA*, *VEGFB*, *ZEB*, *CDH1*) były prawidłowo dobrane do weryfikacji wrażliwości komórek na badane substancje, w kontekście ich przydatności w terapii raka jelita grubego. Zmiany na poziomie ekspresji genów potwierdzane były metodą Western Blot na poziomie ekspresji białek. W prezentowanych pracach stosowano również testy metaboliczne i biochemiczne. Eksperymenty *in vivo* przeprowadzane były na modelu mysim: m.in. testy tumorogenności i ocena histologiczna tworzących się guzów.

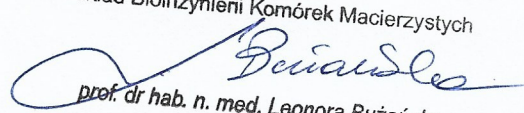
Nie mam wątpliwości, że zastosowana procedura, dobór metod badawczych i ustalenie dawek stosowanych leków są właściwe. W tej ostatniej kwestii nie czuję się ekspertem, ponieważ nie jestem lekarzem, ale jestem pewna, że niekwestionowana wiedza ekspercka w dziedzinie onkologii Promotora, prof. Sergiusza Markowicza oraz wysoka jakość recenzji, którym musiały podlegać publikacje Doktorantki w renomowanych czasopismach, gwarantują prawidłowość otrzymanych wyników.

Przedstawiona do oceny praca doktorska pod względem edytorskim przygotowana jest perfekcyjnie, a konspekt poprzedzający zbiór opublikowanych artykułów napisany jest bardzo ładną polszczyzną. Pracę tę z przyjemnością czytałam również dlatego, że jest ona efektem precyzyjnego planu badawczego i ciągu eleganckich eksperymentów, w którym wyniki prezentowane w kolejnych publikacjach są podstawą do badań podjętych w każdej następnej pracy.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 21 kwietnia 2017 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę o dopuszczenie mgr Agnieszki Świć do dalszych etapów obrony pracy doktorskiej przed Wysoką Radą Naukową Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowego Instytutu Badawczego.

Mając na uwadze wysoką wartość merytoryczną i translacyjną zaprezentowanych badań oraz fakt, że zostały one opublikowane w renomowanych międzynarodowych czasopismach, składam wnioszek o wyróżnienie ocenianej dysertacji.

Prof. dr hab. Leonora Bużańska

KIEROWNIK
Zakład Bioinżynierii Komórek Macierzystych

prof. dr hab. n. med. Leonora Bużańska