

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk
Zakład Onkologii Doświadczalnej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
Ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Recenzja rozprawy doktorskiej
wykonanej przez mgr Agnieszkę Świć
w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowym Instytucie Badawczym
pt. *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.*
Promotor: dr hab. n. med. Sergiusz Markowicz, prof.

Celem badań prowadzonych w ramach recenzowanej rozprawy doktorskiej była ocena możliwości wykorzystania analogów witaminy D oraz inhibitorów kinaz tyrozynowych do wyeliminowania komórek macierzystych nowotworu (CSC) opornych na 5-fluorouracyl (5-FU) w modelu raka okrężnicy. Komórki macierzyste nowotworu są małą subpopulacją komórek w obrębie nowotworów posiadającą zdolność do samoodnawiania, różnicowania i są tumorogenne po przeszczepieniu zwierzętom. Znaczenie kliniczne tych komórek podkreśla fakt, że CSC są odporne na konwencjonalną chemioterapię i radioterapię oraz że istnieje duże prawdopodobieństwo, iż są one źródłem powstawania przerzutów nowotworowych. Wobec tego, uważa się, że CSC są ważnym celem dla poszukiwania nowych leków przeciwnowotworowych czy opracowywania nowych strategii terapeutycznych. Stąd też podjęta przez autorkę tematyka badawcza zakładająca zbadanie czy analogi witaminy D lub inhibitory kinaz tyrozynowych mogłyby mieć zastosowanie w takiej uzupełniającej przeciwnowotworowej strategii terapeutycznej zasługuje na uznanie.

Autorka we wstępnym opisie swoich badań uzasadnia wybór tych dwóch właśnie grup substancji testowanych pod kątem zastosowania przeciwnowotworowego (analogi witaminy D) lub znanych, jako leki przeciwnowotworowe (imatinib i sunitinib). Następnie Autorka przedstawia 2 sformułowane poprawnie cele pracy dotyczące charakterystyki komórek raka okrężnicy traktowanych lekiem przeciwnowotworowym, a następnie inhibitorami kinaz tyrozynowych i/lub analogami witaminy D. Pierwszy cel dotyczy wpływu w/w czynników na odnowę tych komórek po traktowaniu lekiem przeciwnowotworowym, a drugi na zbadaniu ekspresji genów w trakcie tejże odnowy. Ponieważ rozprawę stanowią 4 publikacje, obok streszczeń po polsku i angielsku, wykazu publikacji wchodzących w skład rozprawy, wprowadzenia i wskazanych 2 celów pracy, autorka w opracowaniu poprzedzającym wydruki publikacji omawia kolejno 4 wspomniane publikacje. Omówienie to jest w zasadzie opisem wyników uzyskanych w ramach każdej z tych prac. Uważam, że znacznie lepszym byłoby krótkie omówienie wyników, w logicznej kolejności i tylko tych, które powstały w wyniku samodzielnej pracy Autorki dysertacji (lub przy jej znaczącym udziale), a następnie ich przedyskutowanie, także jako całości z powiązaniem wyników przedstawionych w różnych publikacjach wchodzących w skład dysertacji, co ze względów oczywistych mogło być niemożliwe w poszczególnych publikacjach. Takie opracowanie mogłoby także w sposób jednoznaczny pokazać umiejętności doktorantki w zakresie krytycznej analizy uzyskanych wyników.

W skład dysertacji wchodzi więc cztery wieloautorskie (7-9 autorów) publikacje, opublikowane w latach 2016-2019 w czasopismach o IF 2.991-3.785, cytowane 0-6 razy (bez autocytowań), które omówię w kolejności wskazanej przez Autorkę. Wcześniej jednak chcę wskazać na pewne nieścisłości, a jednocześnie prosić Doktorantkę o wyjaśnienia w czasie obrony doktoratu, dotyczące oświadczeń współautorów tych publikacji. Takie same deklaracje powtarzają się w oświadczeniach Autorki i innych osób np.: w przypadku publikacji nr 2 (*Tumor Biol*) tożsama jest deklaracja 1. i 2. autora publikacji:

wykonanie testów klonogennych; deklaracje dotyczące hodowli komórkowych pokrywają się u 1. i 4. autora. Niespójne są też deklaracje odnośnie analiz qPCR. Zaś np. w publikacji nr 4: tożsamą jest deklaracja 1. i 2. Autora w zakresie hodowli komórkowych, testów klonogennych, przygotowania manuskryptu czy analizy wyników uzyskanych techniką qPCR itp. Nie chcę wymieniać tutaj wszystkich takich spostrzeżeń, które być może mylnie interpretuję. Wobec tego proszę Doktorantkę o jasne określenie „samodzielnej i wyodrębnionej części pracy zbiorowej” (każdej publikacji) będącej składową rozprawy doktorskiej (zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora, Rozdział 1, § 5. 2). Wyniki badań uzyskane przez inne osoby, a w powstawaniu których Doktorantka nie odegrała wiodącej roli, mogą stanowić cenne tło dla osiągnięć Doktorantki i powinny być wyraźnie wyodrębnione. W prosty sposób można było to zrobić w tekście wprowadzającym, opisując w nim tylko wyniki własne, a pozostałe wykorzystując do dyskusji czy wstępu do opisu wyników badań.

Po omówieniu publikacji wchodzących w skład dysertacji, Autorka prezentuje podsumowanie wyników wymieszane z wnioskami. Tutaj, niestety również Autorka nie poprzestała na podsumowaniu wyników własnych badań, a podsumowała wszystkie wyniki wchodzące w skład czterech publikacji. Chciałabym prosić więc Doktorantkę, aby w czasie obrony zaprezentowała jedynie te wnioski, które można wysnuć na podstawie jej własnych badań.

Jak już wspomniałam w tej części pracy wprowadzającej/podsumowującej wyniki badań będących przedmiotem rozprawy doktorskiej, brakuje dyskusji tychże wyników, które będąc dość spójnymi, są świetnym materiałem do tego typu rozważań naukowych i do zderzenia ich z osiągnięciami innych autorów.

Ponieważ obowiązkiem recenzenta jest ocena indywidualnego wkładu kandydata w powstanie pracy zbiorowej (§ 6.5 w/w rozporządzenia), odniosę się tylko do tych części prac, które na podstawie obecnie złożonych oświadczeń nie budzą moich wątpliwości co do wkładu wiodącego Autorki.

Pierwsza praca, opublikowana w *Arch Immunol Ther Exp* w 2017, w której Autorka dysertacji jest trzecim autorem (spośród ośmiu) mieści się w ogólnej tematyce rozprawy, jednakże lekiem przeciwnowotworowym, który zastosowano do wyeliminowania komórek mysiego raka okrężnicy CT26 jest doksorubicyna, nie zaś tytułowy 5-FU. Zgodnie z oświadczeniem, autorka wykonała hodowle oraz rozdział magnetyczny komórek (względem CD133) i wykonała analizy cytometryczne pokazując, że marker CD133 nie wyróżnia komórek opornych na doksorubicynę, jednakże traktowanie komórek CT26/DOX imatinibem hamowało pojawienie się CD133 (na poziomie białka i mRNA). Analizując obrazy z cytometrii przepływowej (Ryc. 7) widzimy drobne zmiany odsetka komórek CD133 pozytywnych (6,39% vs 1,78% - nietraktowane vs traktowane imatinibem). Możliwe, że jest to znacząca różnica, ale aby wyciągać wnioski na podstawie tego doświadczenia potrzebna jest analiza statystyczna kolejnych powtórzeń tego testu. Czy różnica widoczna na Ryc. 8a pomiędzy komórkami traktowanymi i nie traktowanymi imatinibem jest istotna statystycznie? Dodatkowe analizy separowanych komórek względem markera CD133 pokazały, że komórki CD133⁺ mogą mieć niższy potencjał klonogenny i niższą ekspresję niektórych genów, ale brak analiz statystycznych do Ryc. 9 utrudnia interpretację wyników. Podsumowując, wyniki, które uzyskała autorka, opisane w publikacji 1. są ciekawym wprowadzeniem do dalszych badań autorki.

Druga publikacja (siedmiu autorów), w której przypadku Doktorantka jest pierwszym autorem może być w całości uznana za publikację, w której powstaniu Autorka miała wkład wiodący, po rozwianiu wątpliwości dotyczących rozbieżności w deklaracjach poszczególnych autorów. Pracę tą opublikowano w czasopiśmie *Tumor Biol* w 2016 roku. Oceniono tutaj wpływ trzech analogów witaminy D na komórki 2 linii raka okrężnicy pozostałe po potraktowaniu 5-FU. Autorka zaobserwowała, że te komórki, które były niewrażliwe na zastosowane stężenie 5-FU posiadają cechy komórek macierzystych nowotworu, co jest wyraźniej obserwowalne w przypadku komórek bardziej zróżnicowanego raka okrężnicy HT-29 niż w przypadku słabo zróżnicowanego HCT116, wyciągając wniosek, że komórki bardziej zróżnicowane cechuje większa plastyczność niż te słabiej zróżnicowane. Ponieważ intuicyjnie wydaje się to być nielogiczne, dlatego proszę doktorantkę, aby zaproponowała mechanizmy, które mogą leżeć u podłoża obserwowanego zjawiska.

Bardzo ciekawą obserwacją, będącą wynikiem tej pracy jest fakt, że zróżnicowane strukturalnie analogi witaminy D w różny sposób modyfikują ekspresję genów w komórkach ludzkiego raka okrężnicy.

Ponieważ w dyskusji publikacji nie znalazłam wyjaśnienia obserwowanych różnic proszę doktorantkę o przedyskutowanie tego zjawiska, tj. w jaki sposób modyfikacje chemiczne poszczególnych analogów witaminy D mogą wpływać na ich oddziaływanie np. z receptorem witaminy D czy z innymi potencjalnymi celami molekularnymi, z którymi pochodne witaminy D mogą oddziaływać (dotyczy to także publikacji nr 4).

Znaczna część tej pracy (publikacja 1) opiera się na analizach cytometrycznych. Wyniki uzyskane w ten sposób zaprezentowano jedynie w postaci histogramów bądź „dot-plotów”, w niektórych tylko przypadkach pokazując dane liczbowe dotyczące odsetka komórek w poszczególnych bramkach (w przypadku wykresów kropkowych). Pozostałe wyniki omówiono jedynie opisowo nie podając chociażby wartości średniego kanału fluorescencji. Dla żadnego z tych wyników nie pokazano analizy statystycznej z rozrzutem danych. Oczekuję, że w trakcie prezentacji, Autorka przedstawi analizę statystyczną uzyskanych danych, co uwiarygodni wyciągane wnioski. Na podstawie samego tylko wyglądu histogramów trudno wnioskować o efekcie biologicznym, zwłaszcza, jeśli przesunięcia są raczej subtelne. Każdy zaś eksperyment biologiczny wymaga powtórzeń (zakładam, że w publikacjach przedstawiono reprezentatywny wynik spośród kilku biologicznych powtórzeń testu).

Trzecią publikację chciałabym pominąć, gdyż Autorka wspomina w oświadczeniu jedynie o swoim współudziale w niektórych eksperymentach/czynnościach wykonywanych w ramach tej publikacji, ale nigdzie nie znajduję potwierdzenia, na ile ten współudział był istotny. Ponadto Doktorantka jest czwartym autorem tej pracy spośród dziewięciu autorów. Publikacja ta jest w zasadzie analogiczna do tej poprzedniej; badaniom poddano inne analogi witaminy D. Wyniki uzyskane w ramach tej pracy mogłyby być doskonałym źródłem materiału dla Autorki do dyskusji jej własnych wyników.

Czwartą publikację, w której Doktorantka jest pierwszym autorem (spośród ośmiu), a jednocześnie, zgodnie z oświadczeniami (także proszę o wyjaśnienia odnośnie niektórych powtarzających się deklaracji, jak wspomniano wyżej) odegrała wiodącą rolę w jej powstawaniu, można traktować jako logiczną kontynuację badań opublikowanych w pracy 2 (Kotlarz i wsp. 2016), a także wyników badań uzyskanych w pracy 3 (Neska i wsp. 2016). Do badań wybrano analog PRI-2191, który cechował się tym, że zarówno w badaniach Kotlarz i wsp. 2016, jak i Neska i wsp. 2016 obniżał ekspresję genów charakterystycznych dla komórek macierzystych guza, czego nie wykazywał drugi spośród wybranych analogów, PRI-1906. Wartym podkreślenia jest fakt, że kontynuując swoje badania, Autorka postanowiła wprowadzić dodatkową zmienną, tj. prowadziła hodowle, oprócz warunków normalnych (20% tlenu), także w warunkach hipoksji (wybrała 5% stężenie tlenu, jako łagodniejszą formę hipoksji). Dodatkowo, bazując na wynikach uzyskanych w publikacji pierwszej (Przybyszewska i wsp. 2017), włączyła do swoich badań inhibitory kinaz tyrozynowych – imatinib i sunitinib. Autorka wykazała, że PRI-2191 w warunkach normoksji nasila efekt imatinibu dotyczący obniżenia ekspresji genów związanych z komórkami macierzystymi nowotworu w komórkach HCT116 traktowanych uprzednio 5-FU. Z kolei analog PRI-1906 niwelował efekt imatinibu. Przy czym te wnioski oparto tylko o analizę ekspresji genów wykonaną na jednej linii komórkowej i nie poparto ich żadnymi testami funkcjonalnymi. Co ciekawe, sunitinib, w przeciwieństwie do imatinibu promował ekspresję genów związanych z komórkami macierzystymi nowotworu w komórkach HT-29/5-FU, co jest zbieżne z obserwacjami z badań klinicznych, które nie pokazały korzyści płynących z dołączenia sunitinibu np. do schematu FOLFIRI u chorych na raka okrężnicy. Z drugiej strony, sunitinib podobnie jak imatinib, obniżał potencjał klonogenny komórek HT-29/5-FU, hamował migrację komórek. Brakuje odniesienia w dyskusji do tych ostatnich wyników, powiązania ich np. z analizą ekspresji genów. Dodatkowo, metodą western-blot zbadano ekspresję kilku białek w komórkach HT-29/5-FU, w przypadku których zaobserwowano zmiany w ekspresji mRNA. Dlaczego wybrano akurat te białka? Analizując wykresy obrazujące ekspresję genów, inne geny np. *FLT3* i *FLT4* czy *TP63* uległy większym zmianom, niż te wybrane do badań. Może wynika to z analizy statystycznej?

Podobnie, jak w przypadku western-blot (brak analizy densytometrycznej), tak samo w przypadku wszystkich analiz cytometrycznych nie pokazano rozrzutu danych (nawet, jeśli podano procent komórek w poszczególnych bramkach), nie przeprowadzono także analizy statystycznej. Oczekuję, że w trakcie prezentacji, Autorka przedstawi analizę statystyczną uzyskanych danych, co uwiarygodni wyciągane wnioski.

Podsumowując, przeprowadzone badania w ramach pracy doktorskiej mgr Agnieszki Świć (Kotlarz) są ciekawym zbiorem danych, które m.in. mogą sugerować przyczyny niepowodzeń obserwowanych w przypadku prób używania subitinibu u chorych z rakiem okrężnicy. Dodatkowo są cennym źródłem informacji na temat tego, w jak znaczący sposób modyfikacje chemiczne cząsteczki (w tym przypadku witaminy D2 czy D3) mogą wpływać na ich działanie na poziomie molekularnym. Na uwagę zasługuje także model badawczy, jakim są komórki pretraktowane 5-FU, zastosowanym w dawce hamującej proliferację 80% komórek, co prowadzi do pewnej selekcji komórek o cechach komórek macierzystych. Uzyskane dane są więc szerokim i ciekawym materiałem bazowym do dalszych badań nad mechanizmem obserwowanych zjawisk.

Autorka prowadząc swoje badania wykorzystwała cały szereg metod związanych z hodowlami komórkowymi, w tym 3D, wykorzystwała techniki cytometryczne, western blot, a także analizy ekspresji mRNA. Świadczy to o jej dobrym warsztacie badawczym. Autorka deklaruje także, że współuczestniczyła w powstawaniu manuskryptów publikacji, a więc wnioskuję, iż potrafi także samodzielnie opracować wstęp do pracy naukowej, a co ważniejsze poddać krytycznej analizie/dyskusji uzyskane wyniki.

Moje uwagi przedstawione w recenzji nie przeczą faktowi, że nawet bazując tylko na dwóch publikacjach w których powstaniu Autorka odegrała wiodącą rolę, zakres badań i charakter uzyskanych danych daje podstawy do stwierdzenia, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Agnieszki Świć pt. *„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”* stanowi oryginalne rozwiązanie ciekawego zagadnienia naukowego. Doktorantka w pełni zrealizowała założenia i cel pracy, a uzyskane wyniki opublikowała w dobrych czasopismach naukowych. Wobec tego stwierdzam, że w/w rozprawa spełnia wymogi określone w odpowiednich przepisach i wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii-Institutu im. M. Skłodowskiej-Curie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk
Kierownik Laboratorium
Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej