

Warszawa, 28.04.2023

Recenzja pracy doktorskiej mgr Aleksandry Filipiak-Duliban
„Modele 3D jako alternatywne metody badań lekooporności nowotworów”

Badania, które są podstawą przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej dotyczą zagadnienia wpływu mikrośrodowiska nowotworu na odpowiedź terapeutyczną w kontekście przydatności różnych modeli nowotworów w hodowli *in vitro*, jako element predykcji postępu choroby nowotworowej oraz wrażliwości na stosowane leki. Najbardziej naturalne środowisko do badań nad nowotworami zapewniają zwierzęta syngeniczne, w których bez obawy o odrzut przeszczepu można śledzić procesy związane z nowotworzeniem, jednakże wyniki badań przedklinicznych uzyskane na zwierzętach nie zawsze sprawdzają się u ludzi, ponadto z powodów etycznych objęte są Dyrektywą Europejską 3R. Dlatego modele *in vitro* do badań inicjacji i progresji nowotworów, a także ich lekooporności są wciąż przedmiotem poszukiwań i dyskusji naukowych. Szczególnie ważne jest opracowanie wystandaryzowanych ludzkich modeli biomimetycznych, t.j. odzwierciedlających właściwości naturalnego mikrośrodowiska w jakim nowotwór powstaje i wzrasta. Praca eksperymentalna zaplanowana w tej dysertacji dotyczy porównawczej analizy opracowanych przez Doktorantkę dwóch różniących się mechanizmem działania zwierzęcych modeli nowotworów (czerniaka oraz raka nerki) w hodowli 3D *in vitro*, z odpowiadającymi im modelami w hodowli 2D oraz syngenicznymi modelami mysimi *in vivo*. Takie podejście eksperymentalne daje możliwość autentycznej oceny jednej zmiennej, którą jest określona właściwość mikrośrodowiska (warunki 3D lub ciśnienie parcjalne tlenu).

Przedstawiona do oceny dysertacja mgr Aleksandry Filipiak-Duliban, została wykonana w Laboratorium Onkologii Molekularnej i Terapii Innowacyjnych Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie, pod opieką Kierownika Laboratorium i Promotora prof. dr hab. Claudine Kieda, oraz promotora pomocniczego dr Klaudii Brodaczewskiej. Praca wpisuje się ściśle w nurt zainteresowań Pani prof. Claudine Kieda, wybitnego eksperta w zakresie onkoimmunologii, która od wielu lat zajmuje się opracowaniem *in vitro* metod alternatywnych rekonstrukcji biologicznej, chemicznej i fizycznej warunków przypominających naturalne dla rozwoju nowotworu, przy czym szczególne miejsce w badaniach Pani Profesor zajmuje zależność progresji nowotworów od warunków hipoksji i angiogenezy, co stanowi jedno z wiodących zagadnień tej rozprawy.

Recenzowana praca doktorska jest zbiorem trzech związanych tematycznie artykułów, opublikowanych w latach 2021-2022, w międzynarodowych czasopismach naukowych, znajdujących się na liście JCR (Journal Citation Reports), takich jak: *Frontiers in Immunology* (IF: 7.561), *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* (IF: 2.723) oraz *International Journal of Molecular Sciences* (IF: 6,208). Łączny impact factor tych prac jest wysoki i wynosi 16,5. Opublikowanie wyników badań w czasopismach o charakterze „peer review”, w których prezentowane badania podlegają ocenie jakości, niewątpliwie potwierdza ich wysoką wartość naukową i istotną dla dziedziny tematykę.

Rozprawę rozpoczyna strona tytułowa, następnie podane są słowa kluczowe, źródła finansowania, wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy, spis treści, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w j. polskim i j. angielskim oraz wstęp zakończony przedstawieniem założeń i celu pracy wraz z postawieniem hipotezy badawczej. Dołączone zostały kopie dwóch opublikowanych prac eksperymentalnych, w których Doktorantka jest pierwszym autorem,

zakończone zwięzłym podsumowaniem wyników z wnioskami. Rozprawa zawiera również stosowne oświadczenia współautorów oraz bibliografię składającą się z 83 pozycji.

W wykazie stosowanych skrótów i streszczeniu w języku polskim zakradło się wiele błędów językowych (na jednej stronie streszczenia doliczyłam się aż 10-ciu błędów) - nie zmniejsza to wartości merytorycznej, świadczy jedynie o braku należytej staranności edytorskiej. W bardzo dobrze zredagowanych podrozdziałach „Wstępu” ta staranność językowa została już dobrze zachowana.

W poprzedzającym zamieszczone publikacje wprowadzeniu – „Wstępie”, Autorka omawia zagadnienia, które uzasadniają wybór tematu badań. Rozpoczyna od przedstawienia informacji dotyczącej zastosowanych modeli *in vitro*: w celu zweryfikowania uniwersalności oraz użyteczności proponowanego modelu, wprowadza dwa różniące się od siebie mechanizmem działania zwierzęce modele nowotworów – czerniak (B16F10) oraz rak nerki (RenCa). Doktorantka opisuje podłoże genetyczne raka nerki, wskazując na zależności pomiędzy inaktywacją białka VHL (ang.: VHL – von Hippel-Lindau) i zahamowaniem degradacji czynnika indukowanego niedotlenieniem 1 - alfa (ang.: HIF1 α – Hypoxia Inducible Factor 1 α), a zwiększeniem produkcji czynników stymulujących angiogenezę: VEGF (czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego), PDGF (płytkopochodnego czynnika wzrostu) i TGF- α (transformującego czynnika wzrostu alfa).

Kolejny podrozdział „Wstępu”, to „Charakterystyka mikrośrodowiska”, ze szczególnym zwróceniem uwagi na elementy komórkowe oraz pozakomórkowe nowotworu, a także hipoksję, która jest definiowana jako niższe ciśnienie tlenu niż wartość biologicznego ciśnienia parcjalnego tlenu (pO₂) w zdrowych tkankach. W guzach nowotworowych poziom tlenu spada zwykle poniżej 1%, co charakteryzuje stan hipoksji. Taka precyzyjna definicja hipoksji przedstawiona przez Doktorantkę jest bardzo ważna, ponieważ często w literaturze obniżenie *in vitro* poziomu tlenu do stanu typowego dla zdrowej tkanki - fizjologicznej normoksji (fizjoksji), zwykle od 3 do 8% tlenu – jest określany jako hipoksja. Dobrze opracowana rycina przedstawiająca najważniejsze elementy mikrośrodowiska guza ilustruje ten podrozdział.

„Progresja nowotworu i rozwój lekooporności”, to podrozdział „Wstępu”, w którym Doktorantka przedstawia etapy rozwoju choroby nowotworowej - inicjację, promocję oraz progresję, zwracając szczególną uwagę na etap progresji, która obejmuje: indukcję immunosupresji, modulowanie mikrośrodowiska tkankowego, indukcję mechanizmów promujących lekooporność oraz powstawanie przerzutów. Każdy z tych etapów charakteryzuje się określonym profilem ekspresji genów, co Doktorantka bardzo precyzyjnie przedstawiła na podstawie dostępnej literatury. Szczególna uwaga zwrócona jest na proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT) oraz obecność nowotworowych komórek macierzystych (CSC), ponieważ te procesy progresji nowotworu różniące się mechanizmem działania są typowe odpowiednio dla czerniaka i raka nerki. W sposób wyczerpujący Doktorantka opisuje proces oporności wielolekowej (ang.: MDR – Multi Drug Resistance), zwracając uwagę na różne mechanizmy wywołujące.

Ostatni podrozdział wstępu merytorycznego, to „Modele badań nad nowotworami stosowane w biologii”. Wśród standardowych modeli badań nowotworów Doktorantka wymienia modele *in vivo*, ze szczególnym uwzględnieniem syngenicznych modeli zwierzęcych oraz najczęściej stosowane dwuwymiarowe hodowle *in vitro*, linii ludzkich komórek nowotworowych. Autorka zwraca uwagę na liczne niedoskonałości modelu 2D – szczególnie na nienaturalne mikrośrodowisko i warunki przestrzenne w jakich znajdują się komórki nowotworowe. Dlatego przedstawiono alternatywę do takich badań, którą są hodowle trójwymiarowe. W przypadku tego

opisu zabrakło mi bardziej dogłębnego porównania na podstawie dostępnej literatury istniejących modeli nowotworowych 3D, w szczególności porównania modeli organoidów nowotworowych versus sferoidów i prosiłabym o uzupełnienie tych informacji podczas obrony doktoratu.

Przed załączeniem opublikowanych spójnych tematycznie prac Doktorantka przedstawia założenia i cel pracy, jako: „opracowanie uniwersalnego i prostego modelu 3D, który będzie naśladował zjawiska zachodzące w mikrośrodowisku guza, z naciskiem na: trójwymiarowy kształt, gradient ciśnienia tlenu oraz indukcję mechanizmów zwiększających agresywność nowotworu (takie jak: CSC, EMT)” – tutaj tylko drobna dygresja, zamiast słowa „naśladował”, użyłabym „odzwierciedlał”. Ważnym elementem postawionego celu jest standaryzacja procesu otrzymywania hodowli 3D i uniwersalność tych hodowli w kontekście zastosowania do guzów nowotworowych o różnym mechanizmie progresji. Dlatego wybrano model czerniaka charakteryzujący się typowym przejściem epitelialno-mezenchymalnym oraz raka nerki z mechanizmem przerzutów opartym na wzroście populacji nowotworowych komórek macierzystych. Należy podkreślić, że opracowanie hodowli trójwymiarowej sferoidów dla raka nerki jest w tej pracy rozwiązaniem nowatorskim.

Hipoteza postawiona w tej dysertacji jest następująca: „Modele 3D odpowiednio naśladują zjawiska zachodzące w guzie *in vivo* i mogą stanowić lepsze narzędzie do identyfikacji mechanizmów indukujących lekooporność, niż hodowle 2D” – ponownie dygresja, raczej użyłabym stwierdzenia odzwierciedlają, albo korespondują do charakterystyki nowotworu *in vivo*, zamiast „naśladują”. Eksperymentalna weryfikacja tej hipotezy to przedstawione dwie prace oryginalne, w których opracowane modele porównano z odpowiadającymi im syngenicznymi modelami mysimi oraz modelami dwuwymiarowymi. Ponadto wykonano szereg testów z wykorzystaniem leków cechujących się różnym mechanizmem działania (ewerolimus, cisplatyna, doksorubicyna), co umożliwiło weryfikację zjawiska lekooporności w różnych układach eksperymentalnych.

Ważną częścią cyklu prac będącego podstawą rozprawy jest praca przeglądowa opublikowana w *Frontiers in Immunology* (2021) pt. „Tumor Hypoxia Regulates Immune Escape/Invasion: Influence on Angiogenesis and Potential Impact of Hypoxic Biomarkers on Cancer Therapies”. Jest to praca wieloautorska, w której omawiana jest współzależność genów związanych z hipoksją oraz reakcją immunologiczną pojawiającą się w odpowiedzi na proces nowotworzenia. Zwiększona ekspresja genów związanych z hipoksją nowotworów w większości przypadków towarzyszy immunosupresji, a jednocześnie stymuluje angiogenezę, dlatego może być stosowana jako biomarker oraz istotna informacja prognostyczna. Praca ta została opublikowana jako pierwsza w cyklu prac stanowiących rozprawę, a udział Doktorantki w jej powstaniu był istotnym wsparciem merytorycznym do zaplanowania i przeprowadzenia doświadczeń, a następnie opublikowania pozostałych dwóch prac, w których jest pierwszym autorem.

Pierwszą pracą oryginalną przedstawioną do oceny jest publikacja w *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal* (2022) pt.: „Spheroid culture models adequately imitate distinctive features of the renal cancer or melanoma microenvironment”. Celem tej pracy jest optymalizacja i walidacja modeli *in vitro* 3D otrzymanych przez Doktorantkę, w kontekście ich podobieństwa strukturalnego i funkcjonalnego do rzeczywistych *in vivo* guzów nowotworowych otrzymanych po transplantacji tych samych komórek nowotworowych do myszy syngenicznych. Charakterystykę otrzymanych modeli przeprowadzono w układach eksperymentalnych, takich jak odpowiedź na hipoksję, indukcja przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT) oraz selekcja nowotworowych komórek macierzystych (CSC).

Różnorodność dobrze dobranych metod świadczy o świetnym przygotowaniu Doktorantki do roli badacza z dobrym warsztatem eksperymentatora. Wśród zastosowanych metod znajdują się: 1) ilościowa cytometria przepływowa zastosowana do analizy żywotności komórkowej, fazy cyklu komórkowego, aktywności dehydrogenazy aldehydowej (ALDH1) oraz obecności antygenów powierzchniowych typowych dla danej populacji komórek nowotworowych; 2) zaawansowana mikroskopia fluorescencyjna zarówno do obserwacji przyżyciowych jak również analizy immunocytochemicznej preparatów utrwalonych; 3) badania molekularne ekspresji genów z zastosowaniem technik qRT-PCR oraz sekwencjonowania nowej generacji (NGS) – identyfikacja markerów CSC, EMT, hipoksji i innych procesów związanych z cyklem komórkowym oraz metabolizmem; 4) porównawcza analiza bioinformatyczna wyników wielkoskalowych oraz opracowania statystyczne.

Otrzymane wyniki wykazały, że hodowle 3D komórek nowotworowych w zastosowanej przez Doktorantkę metodzie wiszącej kropli można wystandaryzować, a mechanizmy związane z progresją nowotworów mają swoje odzwierciedlenie w ekspresji wybranych genów w sposób swoisty dla danego typu zmiany nowotworowej: w modelu RCC obserwowano wzrost komórek o fenotypie CSC, podczas gdy w modelu czerniaka indukcję zjawiska EMT. Porównanie z modelami *in vivo* nowotworów w myszach syngenicznym wykazało, że badane procesy są odpowiednio odtworzone w sferoidach 3D, pomimo różnicy funkcjonalnej między badanymi nowotworami.

Druga praca oryginalna z prezentowanego cyklu prac dySSERTacji, w której Doktorantka jest pierwszym autorem to „Spheroid Culture Differentially Affects Cancer Cell Sensitivity to Drugs in Melanoma and RCC Models”, opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences* (2022). W tej pracy Doktorantka bada problem lekooporności nowotworów i w tym kontekście bada przydatność otrzymanego modelu sferoidów 3D do badań farmakologicznych i toksykologicznych. Stosując metody immunocytochemiczne i Western Blot, a także badania ekspresji genów przy użyciu RT-PCR i NGS porównano wrażliwość komórek nowotworowych hodowanych w sferoidach 3D do klasycznej hodowli 2D na leki przeciwnowotworowe o różnym mechanizmie działania (doksorubicynę lub cisplatynę i ewerolimus). Oporność wielolekowa (MDR) nowotworów jest związana z nadekspresją białek błonowych - pomp glikoproteinowych należących do rodziny transporterów ABC, które powodują wyrzut leków z komórki, ale również dotyczy wzrostu aktywności enzymów detoksykacyjnych takich jak cytochrom p450 (CYP P450) oraz transfera glutationu-S (GST), jak również modyfikacji procesów związanych z apoptozą, autofagią czy naprawą DNA. Dlatego do badań wybrano leki o różnych punktach uchwytu i różnym mechanizmie działania: ewerolimus jako inhibitor drogi przekazywania sygnału PI3K/AKT/mTOR; cisplatyna jako chemoterapeutyk wiążący się z zasadami DNA (wpływ na proliferację i apoptozę); natomiast doksorubicyna działa wielokanałowo: przez przebudowę chromatyny (wbudowując się w DNA i hamując topoizomerazę II) oraz poprzez generowanie wolnych rodników indukując stres oksydacyjny.

W prezentowanej pracy wykazano, że hodowla komórek nowotworowych w sferoidach, wpływa w różny sposób na ekspresję transportera błonowego MDR1, w zależności od typu nowotworu, ale nie ma wpływu na ekspresję inhibitora kinazy serynowo-treoninowej mTOR. Z drugiej strony Doktorantka wykazała indukcję całego zestawu genów związanych z lekoopornością w sferoidach 3D, w porównaniu z hodowlą 2D (np.: ALDH3A1, CYP2F2, GSTA1, GSTA2, HPGDS) w sposób podobny w obydwu badanych typach nowotworów. Pomimo to wrażliwość na czynniki cytotoksyczne w badanych nowotworach w hodowli 3D była różna: sferoidy czerniaka wykazują mniejszą wrażliwość na ewerolimus, cisplatynę i doksorubicynę, natomiast dla

raka nerki zaobserwowano niską wrażliwość tylko na doksorubicynę. Świadczy to o możliwości indukcji innych szlaków przekazywania sygnału związanych z lekoopornością i otwiera drogę do dalszych badań.

Badania przedstawione w obydwu powyższych oryginalnych pracach stanowią dobrze udokumentowaną pracę eksperymentalną o wysokiej wartości merytorycznej.

Wyciągnięte przez Doktorantkę wnioski końcowe w rozdziale „Podsumowanie i wnioski” są zgodne z otrzymanymi wynikami. W rozdziale „Podsumowanie i wnioski” (a także w „Streszczeniu”) Doktorantka stwierdza, iż pomimo aktywacji podobnych szlaków przekazywania sygnału to nie udało się zidentyfikować zmian powodujących lekooporność w sferoidach 3D. Wskazuje to na umiejętność wnikliwej analizy i krytycznego, racjonalnego podejścia do otrzymanych wyników przez Doktorantkę, a jednocześnie świadczy o dużej dojrzałości Doktorantki jako badacza. Zgadza się również z ogólnym wnioskiem płynącym z tej pracy, iż „hodowla 3D może być istotna w badaniach nad fizjologią raka jako alternatywa dla standardowych metod, przez co może ona potencjalnie zostać wykorzystane do testów z zastosowaniem komórek pochodzących od pacjentów, jako klinicznie istotny i łatwo dostępny instrument”.

Reasumując uważam, że przedstawiona 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) i jednocześnie składam wniosek do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Filipiak-Duliban do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, w związku z wysoką jakością przeprowadzonych prac eksperymentalnych, a także umiejętnością analizy wyników badań, w szczególności wysokoskalowych badań transkryptomu (NGS), przy zastosowaniu analizy *in silico* i nowoczesnych baz danych, a także (jak wspomniałam wyżej) umiejętnością krytycznego podejścia przez Doktorantkę do otrzymanych wyników, wnoszę o wyróżnienie przedstawionej do recenzji Rozprawy Doktorskiej.

Z wyrazami szacunku



Prof. dr hab. Leonora Bużańska