Prof. dr hab. n. med. Czesław Radzikowski

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Beaty Filip-Psurskiej pt. „Skuteczność działania przeciwnowotworowego analogów witaminy D w skojarzeniu z wybranymi cytostatykami w modelu raka gruczołu sutkowego".

Chemioterapia przeciwnowotworowa to najmłodsza dziedzina postępowania w leczeniu chorych, która w sposób istotny uzupełniła stosowane wcześniej metody chirurgicznego usuwania zamian nowotworowych, czy też ich niszczenia napromienianiem, a poprzedziła rozwój immunoterapii. Przyjmuje się, że początkiem jej rozwoju było wykorzystanie obserwacji o niszczącym działaniu gazu musztardowego na szpik kostny marynarzy, narażonych na wybuch gazu musztardowego na zbombardowanym statku w porcie Barii i zatruciu kilkuset osób, u których stwierdzono uszkodzenie szpiku kostnego i węzłów chłonnych. Alfred Gilman i Louis Goodman przeprowadzili eksperyment z iperytem azotowym na myszach z przeszczepionym chłoniakiem, który w wyniku leczenia uległ regresji. Torakochirurg Gustaf Lindskog przekonał ich do dokonania próby u chorego z chłoniakiem nie ziarniczym powodującym niedrożność dróg oddechowych. Korzystne wyniki tego badania wykonanego w 1943 roku ujawniono w 1946 roku. Cyklofosfamid był pierwszym wprowadzonym do leczenia u ludzi cytostatykiem. Drugi przykład cytostatyku był wynikiem wykorzystanej obserwacji w leczeniu zmian skórnych w białaczce u dzieci kwasem foliowym, przyśpieszający rozwój zmian. W 1948 roku Sidney Farber w Bostonie zapoczątkował stosowanie antymetabolitu kwasu foliowego – amethopteryny (metotrexatu) w leczeniu białaczki limfatycznej, a także i innych nowotworów, nie tylko układu krwiotwórczego.

Dysponowanie bogatym zbiorem czynników hamujących wzrost nowotworowy przyczyniło się znacząco do postępu badań nad mechanizmami nowotworzenia, nad poznaniem biologii nowotworów, wskazując nowe cele komórkowe i molekularne dla regulacji a właściwie hamowania rozwoju i wzrostu nowotworu, jego rozprzestrzeniania się miejscowego i tworzenia odległych przerzutów. Poznano także udział czynników ustrojowych w oddziaływaniach lokalnych (wpływ mikrośrodowiska), jak i ogólnoustrojowych, w tym udział czynników hormonalnych i humoralnych i komórkowych czynników układu odpornościowego w patogenezie tego procesu chorobowego. Do dynamicznego postępu tej dziedziny badań przyczyniło się znacząco szerokie wykorzystywanie modeli doświadczalnych, jakimi okazały się hodowle komórek nowotworowych in vitro oraz modele, głównie myszy szczepów wsobnych i z obniżoną czy wyłączoną funkcja układu odpornościowego, akceptujące wzrost także ludzkich komórek nowotworowych.

Badania wchodzące w zakres ocenianej rozprawy doktorskiej mgr inż. Beaty Filip-Psurskiej wykonane zostały w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN pod kierunkiem dr hab. Joanny Wietrzyk, promotora ocenianej rozprawy. Doktorantka w swej dysertacji przedstawia sposób przeprowadzenia i uzyskane wyniki badań nad

poznaniem skuteczności i sposobu działania przeciwnowotworowego wybranych dwóch analogów witaminy D3 stosowanych w monoterapii lub w kojarzeniu z wybranymi trzema cytostatykami w układzie modeli doświadczalnych jakim były komórki linii raka gruczołu piersiowego pasażowane in vitro lub przeszczepiane in vivo. W opisanych szczegółowo i przeprowadzonych prawidłowo doświadczeniach in vitro zbadała efekt badanych czynników terapeutycznych bezpośrednio na komórki nowotworowe. Natomiast w doświadczeniach in vivo (myszy odpowiednich szczepów wsobnych) zaszczepione komórkami linii mysich raków gruczołu sutkowego lub myszy o obniżonej funkcji układu odpornościowego zaszczepione komórkami linii ludzkiego raka piersi zbadała, zgodnie z obowiązującą strategią i protokołem badań czynników leczniczych, w fazie pierwszej oddziaływanie lek - komórka nowotworowa, następnie triadę czynników –„ lek – komórka nowotworowa – wpływ organizmu na efekt zastosowanego leczenia".

We WSTĘPIE liczącym 36 stron maszynopisu opartym na właściwie dobranych, także aktualnych informacjach z bogatego piśmiennictwa (226 pozycji), w tym znaczącym dorobku macierzystego Laboratorium przedstawia istotne dane na temat patogenezy raków gruczołu sutkowego, w tym także rolę estrogenów, ich receptorów, rolę selektywnych jego modulatorów oraz inhibitorów aromatazy, rolę witaminy D i jej receptorów, także ich rolę w leczeniu. Podane wzory chemiczne badanych preparatów, ryciny ilustrujące omawiane zagadnienia stanowią bogate źródło informacji dobranych celowo, a także interesująco dla zrozumienia intencji autorki rozprawy, która w kolejnym podrozdziale przedstawia „potencjalne możliwości wykorzystania witaminy D oraz jej analogów w leczeniu chorych na raka piersi". Podrozdział ten poprzedzony jest przedstawionym schematem opracowanym na podstawie pracy Cristina K. Deeba pt." Szlaki sygnałowe w komórkach raka gruczołu sutkowego, w których uczestniczy kalcitrol, aktywna forma witaminy D3".

ZAŁOŻENIA I CEL PRACY to kolejny rozdział przedstawiający założenia i cele pracy sformułowane w 5 punktach: (1) ocenę zahamowania proliferacji badanych komórek nowotworowych pod wpływem podawanych analogów PR-2191 i PRI-2205 także stosowanych łącznie z anastrozolem i gemcytabiną; (2) zbadanie wpływu obu analogów zastosowanych samodzielnie oraz w skojarzeniu z anastrozolem na cykl komórkowy,(3) na szlaki przekazywania sygnałów związanych z estrogenami i na aktywność aromatazy in vitro, (4) ocenę wpływu obu analogów na aktywność przeciwnowotworową in vivo, podawanych także łącznie z cyklofosfamidem, gemcytabiną i anastrozolem i (5) ocenę działania przeciw przerzutowego stosowanych schematów leczenia badana w modelu 4T1 (mysi rak przerzutujący gruczołu sutkowego).

Rozdział MATERIAŁY I METODY zawarty jest na 7-miu stronach (55-61). Podane są szczegółowe informacje opisowe lub zebrane tabelarycznie na temat stosowanych w badaniach odczynników, ich nazwy i pochodzenie. Kolejna informacja dotyczy linii komórkowych. W układzie tabelarycznym podano ich nazwy, rodzaj nowotworu i jego pochodzenie (mysie czy ludzkie), nazwy receptorów, ich obecność lub brak, stosowane do hodowli podłoża i ich pochodzenie. Podobnie

przedstawione zostały informacje o zwierzętach doświadczalnych. W tabeli podano wykaz szczepów i ich charakterystykę, pochodzenie, wiek, warunki hodowli (konwencjonalny, SPF), model nowotworowy. Bogata w informacje kolejna tabela podaje informacje szczegółowe o schematach prowadzonych doświadczeń terapeutycznych. Opisowo podano informacje o źródle pochodzenia wybranych do badań dwóch analogów witaminy D3 (z bogatego zbioru analogów otrzymywanych w ramach współpracy z prof. Andrzejem Kutnerem z Instytutu Farmaceutycznego w Warszawie) oraz informacje o stosowanych trzech wyżej wymienionych chemioterapeutykach.

Kolejno w pracy podane są informacje szczegółowe o **doświadczeniach in vitro**, w tym o metodach badania zahamowania proliferacji, sposobach oceny efektu zahamowania proliferacji i metodzie oceny statystycznej. Następnie podane są sposoby oceny fazy cyklu komórkowego, przygotowania komórek, także z guzów nowotworowych do badań cytometrycznych {oprogramowanie Cell Quest(BD)}. Kolejno przedstawione są metody badania ekspresji receptorów estrogenowych komórek z hodowli i z guzów do oceny w Cytometrze przepływowym FACS przy oprogramowaniu Cell Quest i poddane analizie statystycznej w programie Statistica 7.1. Kolejno podane są informacje o sposobie i wynikach analizy wybranych białek w guzach nowotworowych (MCF-7) metodą Western blotting. Aktywność aromatazy badana była dwoma sposobami: albo pośrednio przez badanie poziomu syntezy 17β estradiolu w surowicy lub w medium hodowlanym, drugi sposób przez wykorzystywanie zestawu do badania aktywności enzymu CYP19 (aromataza) przy wykorzystywaniu czytnika płytek Synergy H4 firmy Biotek przy oprogramowaniu Gen 5 i analizie statystycznej w programie Excell 2010. Analizę ekspresji wybranych genów związanych z estrogenowym szlakiem przekazywania sygnałów w komórkach linii MCF-7 badano metodą Real Time PCR (w czasie rzeczywistym) wykorzystując macierz firmy Biomol GmbH o nazwie Human Estrogen Signaling Primer Library, zawierającą zestawy starterów dla 88 genów związanych z estrogenowym szlakiem przekazywania sygnałów i 8 starterów dla genów kontrolnych.

Badana In vivo Aktywność przeciwnowotworową badano u myszy zaszczepionych komórkami mysich lub ludzkich linii nowotworowych raka gruczołu sutkowego, które poddawano obserwacji, mierzeniu objętości rosnących guzów, oceniając zahamowanie wzrostu guzów. Oznaczano także zmiany masy ciała. Myszy zaszczepione komórkami ludzkich linii raka otrzymywały implanty estrogenowe, uwalniające dziennie 0.002mg 17β estradiolu. Pomiary wzrostu guzów nowotworowych, ocenę zahamowania ich wzrostu, wydłużenia czasu przeżycia, zmiany masy ciała, efekt addytywny czy synergistyczny działania leków czy ich kombinacji dokonywano i oznaczano zgodnie z obowiązującym protokołem tych badań. Stężenia wapnia w surowicy myszy oznaczano w analizatorze Cobasa C11 (Roche Diagnostic, Bazylea). Parametry morfologiczne krwi myszy badane były w Laboratorium Diagnostyka. Wyniki badań poddane były ocenie statystycznej – wyniki badań in vitro w programie Statistica &.1. (StatSoft.Pl), także testy nieparametryczne Kruskal-Wallis ANOVA, także test do wielokrotnych porównań danych (Multiple Comparison p values -2-tailed). Dla oceny statystycznej wyników badań in vivo

zastosowano także testy nieparametryczne (jak wyżej), dodatkowo wykorzystywano test U Mann-Whitney'a. Analizę statystyczną różnic w czasie przeżycia (ILS) przeprowadzono za pomocą testu Peto&Peto z Modyfikacją Gehan-Wilcoxona. Szczegóły analiz i ich oceny zostały umieszczone pod odpowiednimi rycinami w wynikach.

WYNIKI przeprowadzonych doświadczeń opisane są szczegółowo dla wykonanych doświadczeń in vitro i doświadczeń in vivo. Ich omówienie i prezentacja zajmuje ogółem 31 stron, w tym badania in vitro przedstawione są na 22 stronach, na 10 rycinach i 4 zestawieniach tabelarycznych. Wyniki badań in vivo zawarte zostały na 44 stronach, na 33 rycinach i 2 tabelach. **W badaniach in vitro** Doktorantka wykazała, że oba analogi witaminy D3 hamują proliferację badanych linii komórek raka gruczołu sutkowego zarówno wykazujących ekspresję receptorów estrogenowych, szczególnie ERα, jak i ich brak oraz receptora dla witaminy D3 (VDR). Zastosowanie obu badanych analogów łącznie z anastrozolem powodowało wzmocnienie jego działania wobec badanych linii komórek nowotworowych niezależnie od stopnia ekspresji receptora estrogenowego. Synergizm działania kalcitrolu i obu analogów stosowanych łącznie z anastrozolem wykazano wobec ludzkich komórek linii MCF-7 i SKBR-3 . Wysoką aktywność przeciw wzrostową obu analogów wykazano wobec komórek ludzkiej linii T47D, a podane łącznie z anastrozolem wykazywały jedynie efekt addytywny. Doktorantka wykazała działanie modulujące ekspresję receptora estrogenowego alfa w komórkach linii MCF-7, natomiast statystycznie znamienne różnice wykazała w doświadczeniach, w których oba analogi stosowane były łącznie z anastrozolem. W badaniach zdolności obu analogów do hamowania aktywności aromatazy wykazała, że analog PRI 2191 wykazuje taką zdolność w dawce 100 nM, nie obserwowano jednak jego aktywności w zdolności komórek MCF-7 do wytwarzania 17-β estradiolu w warunkach in vitro. W tabeli nr 11 przedstawiono ocenę ekspresji zbioru genów związanych z estrogenowym szlakiem przekazywania sygnałów w komórkach linii MCF-7, zaznaczając zmiany w ekspresji genów związanych z tym szlakiem, a spowodowanych podaniem obu badanych analogów pojedynczo i/lub łącznie z anastrozolem. Do dalszych badań wybrano 7 genów jako szczególnie interesujących.

W bogato ilustrowanej dokumentacji **wyników badań in vivo** (zawarte zostały na 44 stronach, na 33 rycinach i 2 tabelach) wykazano słabe współdziałanie analogów witaminy D3 z cyklofosfamidem, gemcytabiną czy anastrozolem u myszy zaszczepionych komórkami mysich linii raka gruczołu sutkowego. Natomiast w doświadczeniach, w których myszy zaszczepione były komórkami ludzkiej linii raka MCF-7 oba analogi podawane samodzielnie wykazały znaczne ograniczenie wzrostu guzów nowotworowych. Analogi zastosowane łącznie z gencytabiną wykazały słaby efekt wzmacniający działanie tego leku. Badanie poziomu wapnia w surowicy krwi myszy wykazało brak toksyczności obu analogów, także anastrozolu w stosowanych dawkach terapeutycznych. U myszy otrzymujących skojarzone „leczenie" obserwowano niższy poziom 17β-estradiolu w surowicy, podobny efekt obserwowano u myszy po podaniu wyłącznie analogów. W guzach nowotworowych myszy zaszczepionych komórkami linii MCF-7, którym podawano badane analogi

witaminy D3 był podwyższony poziom receptora VDR oraz hydrolazy 1α-hydrolazy witaminy D3 (CYP27B1). Natomiast oba analogi po podaniu łącznym z anastrozolem powodowały obniżenie tej hydrolazy w porównaniu z kontrolą. Obserwowano różnicę w poziomie VDR, który wzrastał w guzach myszy traktowanych analogiem PRI-2191 i anastrozolem, a obniżał się w guzach myszy otrzymujących kombinację anastrozolu z analogiem PRI-2205. Nie wykazano toksyczności kalcemicznej badanych analogów oraz anastrozolu w stosowanych schematach terapeutycznych.

W kolejnym, piątym rozdziale Doktorantka w 11 punktach **podsumowuje wyniki swoich badań** i rozdział ten poprzedza zawartą na **stronach 151-164 DYSKUSJĄ**. W konfrontacji wyników badań in vitro i in vivo Doktorantka zestawia swoje wyniki z danymi z bogato cytowanego piśmiennictwa (226 pozycji, w tym ponad 40 wyliczyłem z ostatnich dwóch lat (2015-2016). Świadczy to, że wcześniej uzyskane wyniki badań własnych zostały przeanalizowane także z aktualnymi stanem wiedzy z wciąż pozostającymi w centrum uwagi badaniami w tej dziedzinie. Kojarzenie witaminy D3 i jej analogów ze stosowanymi cytostatykami do wspomagania terapii, poprzez zmianę fenotypu komórki nowotworowej (zmiana ekspresji cząsteczek adhezyjnych uczestniczących w procesie inwazji i tworzenia przerzutów, jak słusznie podkreśla Doktorantka wpływać może na przedłużenie życia, czy poprawienie jego jakości, między innymi także z uwagi na występujące u chorych na raka piersi zaburzenia gospodarki wapniowej i hormonalnej. Inny aspekt rozważań Doktorantki wynikający z własnych doświadczeń, nad wpływem analogów witaminy D3 potwierdza znane z piśmiennictwa korzystne działanie kalcitrolu i analogów witaminy D3 obniżające ekspresję receptorów estrogenowych i aromatazy w komórkach raka piersi u leczonych kobiet.

Wyniki swoich badań nad mechanizmem wrażliwości komórek nowotworowych na kalcitrol i jego analogii zestawia z danymi z piśmiennictwa na temat możliwości regulacji procesów komórkowych przez inne niż VCR receptory dla naskórkowych czynników wzrostowych (HER1, HER2, czy IGFR/ILR). Badania Doktorantki uwrażliwiania komórek nowotworowych przez oba analogi kalcitrolu stosowane łącznie z gemcytabiną, czy cyklofofamidem wykazały niższą skuteczność zastosowanego programu leczenia w porównaniu do efektów kojarzenia analogów z anastrozolem. Na uwagę zasługuje wynik w modelu in vivo komórek linii MCF-7, w którym analog 2191 wzmagał działanie przeciwnowotworowe gemcytabiny, zmniejszając jej toksyczność u leczonych myszy bezgrasiczych.

Interesująca część dyskusji dotyczy oceny efektu stosowania analogów kalcitrolu z anastrozolem, który jest silnym i selektywnym niesterydowym inhibitorem aromatazy. Po związaniu się anastrozolu z miejscem aktywnym aromatazy, zmniejsza się lokalna produkcja estrogenów, aktywowany zostaje szlak JNK-MAPK, inaktywowane są białka antyapoptotyczne Bcl-2 i Bcl-x1. Badanie ekspresji mRNA wykazało obniżoną transkrypcję genów receptorów estrogenowych alfa i beta w komórkach traktowanych kalcitrolem i jego analogami. Badania in vivo potwierdziły działanie korzystne stosowania łącznego anastrozolu z każdym z obu analogów. Doktorantka stwierdziła pewne różnice w działaniu badanych analogów kalcitrolu. Analog PRI-2191 w połączeniu z anastrozolem istotnie zmniejsza poziom 17β-

estradiolu i wapnia w surowicy myszy oraz ekspresję receptora estrogenowego alfa w komórkach nowotworowych. Obserwowano obniżoną transkrypcję mRNA dla genów aromatazy, sulfotransferazy estrogenowej, dla receptora estrogenowego alfa. Natomiast w przeciwieństwie do analogu PRI-2205 zwiększa ilość RNA receptora dla hormonu folikulotropowego FSH w komórkach MCF-7. Analog PRI-2105 w połączeniu anastrozolem w większym stopniu niż PRI-2191 obniża transkrypcję mRNA dla genów aromatazy, sulfotransferazy estrogenowej i receptorów estrogenowych alfa i beta.

Poza omówionymi wyżej rozdziałami praca zawiera spis treści, streszczenie polskie i angielskie, wykaz skrótów, spis rycin (56 rycin) i 15 tabel, z których ostatnia zawarta na 3 stronach w suplemencie zawiera ocenę ekspresji zbioru kilkudziesięciu genów związanych z estrogenowym szlakiem przekazywania sygnałów w komórkach nowotworowych ludzkiej linii MCF-7 po 72 godzinnej ekspozycji na badane analogi witaminy D3 stosowane pojedynczo lub łącznie z anastrozolem.

Rozprawa zakończona jest czterema ujętymi niezwykle syntetycznie wnioskami, dla sformułowania których Doktorantka wykonanymi badaniami i uzyskanymi wynikami posiada pełne uzasadnienie.

Oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki ustawowe. Doktorantka uzasadniła przekonująco - w oparciu o dobrze dobrane i wykorzystane informacje z piśmiennictwa - założenie i cele swoich badań, które zaprogramowała i przeprowadziła zgodnie z obowiązującymi w tej dziedzinie badań zasadami. Uzyskała nowe wyniki, interesujące dla zespołów zajmujących się tym kierunkiem badań nad udziałem analogów witaminy D3 w złożonej terapii przeciwnowotworowej. Nie zgłaszam krytycznych uwag merytorycznych. Uwagi krytyczne dotyczą niepełnego wykazu znaczenia skrótów stosowanych w części opisowej maszynopisu pracy, co utrudnia bieżące zapoznawanie się z treścią oraz nielicznych tzw. "literówek".

Na podstawie swojej pozytywnej oceny rozprawy i wysokiej oceny uzyskanych wyników przeprowadzonych badań, których wykonywanie było finansowane grantem MNiI w latach 2006-2009 i nadal jest finansowane grantem NCN od roku 2013 do 2017 oraz zostało częściowo opublikowane w pracy oryginalnej w roku 2013 i jest przedmiotem dwóch zgłoszeń patentowych (polskiego i brytyjskiego) ze współudziałem Doktorantki, przedkładam swoją pozytywną ocenę PT Członkom Wysokiej Komisji Rady i Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu oraz wniosek o dopuszczenie mgr inż. Beaty Filip-Psurskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 2016.08.25.

Prof. dr hab. n. med. Czesław Radzikowski

INSTYTUT IMMUNOLOGII
I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
Polskiej Akademii Nauk
53-114 Wrocław, ul. Rudolfa Weigla 12
tel.: 71 337-11-72, fax: 71 337-13-82
NIP: 896-000-56-96