

Gliwice, 2.09.2024

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ mgr Agnieszki Szyposzyńskiej

Tytuł rozprawy: „Wpływ pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z mezenchymalnych komórek macierzystych na zahamowanie aktywności biologicznej nowotworowych komórek macierzystych raka jajnika.”

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska obejmuje dwa woluminy – jeden, główny, liczący 118 stron, zatytułowany „Rozprawa doktorska”, oraz drugi, liczący 24 strony, który ma charakter skrótowego omówienia pracy doktorskiej. Drugi wolumin nie został zatytułowany, dla wygody będę go nazywać „Omówieniem”.

Rozprawa doktorska zawiera następujące rozdziały: Streszczenie w jęz. polskim, Streszczenie w jęz. angielskim, Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Oświadczenia współautorów, Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz Wnioski.

Omówienie zawiera następujące rozdziały: Wprowadzenie, Cel pracy, Omówienie wyników, Wnioski, Dorobek naukowy, Bibliografia.

Prace oryginalne wchodzące w skład rozprawy doktorskiej stanowią spójny cykl badań nad wpływem mikropęcherzyków (MV) z mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej na właściwości komórek raka jajnika.

W pierwszej pracy (Szyposzyńska i wsp. 2020) wykonano szczegółową charakterystykę mikropęcherzyków izolowanych z medium znad komórek HATMSC2. Warto zaznaczyć, że jest to linia komórkowa wyprowadzona przez zespół prof. Aleksandry Klimczak, otrzymana poprzez unieśmiertelnienie komórek macierzystych brzusznej tkanki tłuszczowej od zdrowego dawcy, za pomocą plazmidów hTERT i pSV402.

Potwierdzono, że zarówno komórki HATMSC2 jak i pochodzące z nich mikropęcherzyki wykazywały powierzchniową obecność markerów mezenchymalnych komórek macierzystych (CD73, CD90 i CD105) oraz HLA ABC, zaś nie wykazywały obecności panleukocytarnego markera CD45. Rozmiar mikropęcherzyków wyznaczono dwiema metodami, w izolatach wykazano obecność jednorodnej populacji pęcherzyków o średnicy ok. 456 nm. Za pomocą znakowania fluorescencyjnego potwierdzono internalizację MV przez komórki raka jajnika (linie komórkowe ES2 i OAW42). Właściwości przeciwnowotworowe MV oceniano przy użyciu testu MTT i cytometrii przepływowej. Białkowy profil wydzielniczy komórek raka jajnika oceniano za pomocą mikromacierzy przeciwciał.

Obie linie komórkowe internalizowały MV; mikropęcherzyki wywierały działanie proapoptotyczne i/lub nekrotyczne na komórki ES-2 i OAW-42 oraz zwiększały ekspresję czynników przeciwnowotworowych w obu liniach komórkowych w porównaniu z kontrolą. Komórki OAW-42 wykazały statystycznie znamienne spadki proliferacji w 3 dobie po traktowaniu MV w proporcji 100:1, zaś w przypadku komórek ES2 spadek ten był nieznamienne. Nasuwa mi się tutaj pytanie – czy tak wysoka proporcja MV nie będzie

stanowić problemu technicznego w przypadku prób zastosowania MV w terapii? Prosiłabym Doktorantkę o podzielenie się swoimi przemyśleniami w tej sprawie.

Mam jeszcze na marginesie uwagę dotyczącą pochodzenia histologicznego komórek ES2 i OAW-42. Są to linie komórkowe wyprowadzone dziesiątki lat temu; wyniki współczesnych badań morfologicznych, genetycznych i in. podają w wątpliwość tradycyjnie przypisywane im pochodzenie histologiczne [1, 2, 3, 4]. Beufort i wsp. [1] uznają linię ES2 za pochodzącą z raka jasnokomórkowego, ale Anglesio i wsp. [2] uważają, że nie jest to rak jasnokomórkowy, a Domcke i wsp. klasyfikują komórki ES2 jako „possibly HGSOV” (high-grade serous ovarian cancer) [3]. Z kolei linia OAW42 przez większość badaczy uznawana jest za raka surowiczego, ale nie niskozróżnicowanego (high-grade) [3]; wątpliwości budzi jednak fakt, że w linii tej występują mutacje w genach *ARID1A* i *PIK3CA*, typowe dla raków jasnokomórkowych i endometrioidalnych.

W pracy nr 2 (Szyposzyńska i wsp. 2023) testowano wpływ MV na pierwotne linie komórkowe wyizolowane z materiału pooperacyjnego i/lub płynu puchlinowego od 16 pacjentek z nowotworami jajnika (10 pacjentek z niskozróżnicowanym rakiem surowiczym, 2 pacjentki z rakiem jasnokomórkowym, 2 z rakiem śluzowym, 1 z torbielakogruczolakowłóknakiem, 1 z guzem z przewodu Mullera). Testy wykonano w układach 2D i 3D. MV były internalizowane przez komórki raka jajnika, co w przypadku niektórych próbek prowadziło do obniżenia aktywności metabolicznej komórek i tempa migracji oraz indukcji apoptozy. Za pomocą mikromacierzy przeciwciał zidentyfikowano czynniki proapoptotyczne występujące w MV, które mogą mieć wpływ na ich antynowotworowe działanie.

Biorąc pod uwagę zróżnicowany wpływ MV na komórki raka jajnika obserwowany w przypadku różnych próbek, istotne byłoby znalezienie markerów predykcyjnych odpowiedzi na ten rodzaj potencjalnej terapii. Znalezienie takich markerów może być trudne, biorąc pod uwagę fakt, że odpowiedź na MV może być zróżnicowana nie tylko pomiędzy poszczególnymi pacjentami, ale także wykazywać zróżnicowanie w przypadku komórek od jednego pacjenta. Widać to na Ryc. 9, w przypadku trzech sparowanych preparatów komórkowych (OvCa3T i OvCa3A, OvCa17T i OvCa17A oraz OvCa19A i OvCa19T). W przypadku pacjentki nr 3, w komórkach z guza obserwujemy antyapoptotyczny efekt MV, a w komórkach z płynu puchlinowego - brak efektu. U pacjentki nr 17 - brak zmian w przypadku komórek z guza, natomiast obserwujemy efekt proapoptotyczny w stosunku do komórek z płynu puchlinowego. Jedynie u pacjentki nr 19 w obu przypadkach obserwujemy efekt terapeutyczny.

Nota bene, wstępne poszukiwanie markerów predykcyjnych można wykonać na bazie już istniejących wyników – szukając korelacji pomiędzy wpływem MV na poszczególne preparaty komórkowe, a ekspresją licznych markerów, które zostały oznaczone. W pracy przeprowadzono bowiem obszerne fenotypowanie (za pomocą FACS, IHC i q-RT-PCR) komórek z tkanki pooperacyjnej i płynu puchlinowego, pod kątem obecności markerów MSC i CSC oraz markerów pluripotencji (Oct4 i Sox2), EMT oraz innych wybranych genów (m.in. c-myc, p53 i p21), obserwując zróżnicowaną ekspresję tych markerów w zależności od pochodzenia komórek.

Na marginesie – w Omówieniu, Autorka błędnie nazywa transkrypty genów *TP53*, *p21* i *c-MYC* „transkryptami protoonkogennymi”. *TP53* jest genem supresorowym, a nie onkogenem, a *p21* nie zalicza się do żadnej z tych kategorii.

Praca nr 3 (Szyposzyńska i wsp., 2024) opisuje wyprowadzenie dwóch ustalonych linii komórkowych raka jajnika z płynu puchlinowego od pacjentek nr 3 i nr 7, unieśmiertelnionych za pomocą hTERT, oraz szczegółową analizę tych linii w odniesieniu do wyjściowych pierwotnych komórek. Obie linie ekspresyjnie wykazują markery charakterystyczne dla niskozróżnicowanego raka surowiczego (p53 i PAX8). Akumulacja p53 wskazuje na selekcję komórek ze zmutowanym genem TP53. Linia OvCa7AhTERT jest przez autorów rekomendowana jako potencjalny model do badań nad CSC raka jajnika. Charakteryzuje się

ona ekspresją markerów mezenchymalnych CD90 i CD105, a także markerów pluripotencji SOX2 i OCT3, oraz markerów CSC - CD133, CD44 i ALDH1, a także wyższą aktywnością metaboliczną i tempem migracji niż komórki wyjściowe. Jest to niewątpliwie wartościowy model badawczy, jednak w mojej opinii, dla potwierdzenia właściwości CSC konieczne byłoby oznaczenie tumorogenności komórek OvCa7AhTERT in vivo.

Jeżeli chodzi o ocenę prac oryginalnych składających się na rozprawę doktorską, to należy podkreślić, że jest to obszerny i spójny zestaw badań, wykonany z użyciem szerokiej gamy nowoczesnych metod badawczych, o niekwestionowanym wkładzie własnym mgr Agnieszki Szyposzyńskiej. Prace te przeszły pomyślnie proces recenzji, trudno zatem recenzować je po raz kolejny. Mogę więc mieć jedynie drobne uwagi i sugestie, które zamieściłam powyżej.

Słabszym elementem rozprawy doktorskiej jest, w mojej ocenie, polskojęzyczne Omówienie pracy. Mam tutaj sporo uwag, które nie mają na celu podważenia jakości badań wykonanych przez Doktorantkę, a jedynie mają za zadanie zwrócenie uwagi na pewne niedociągnięcia. Nie ulega wątpliwości, że Doktorantka odebrała swoje wykształcenie w zespole wysokiej klasy specjalistów w zakresie badań nad komórkami macierzystymi. Widać jednak, że jej wiedza w obszarze biologii i kliniki nowotworów wymaga jeszcze dalszego szlifowania. Byłoby z pożytkiem, gdyby Doktorantka pisząc rozprawę poprosiła o konsultację tekstu kolegów klinicystów (np. dr Rafał Soznański, czy dr Marek Murawski). Również prof. Julia Bar mogła wnieść wiele pomocnych uwag do fragmentów poświęconych specyfice raka jajnika i zagadnień klinicznych.

We wstępie Omówienia pracy Doktorantka referuje epidemiologię raka jajnika bazując na dość niefortunnie dobranej pracy (Torre i wsp., Ovarian Cancer Statistics, 2018). Praca ta omawia szczegółowo statystyki amerykańskie, skupiając się na różnicach pomiędzy grupami etnicznymi typowymi dla społeczeństwa amerykańskiego (np. biali nie latynosczy, czarni, wyspiarze Azji/Pacyfiku, itp.).

W tym akapicie warto też zwrócić uwagę na niuanse terminologii onkologicznej. W terminologii anglosaskiej stosowany jest powszechnie termin „cancer”, który oznacza „nowotwory złośliwe” (tj. odnosi się do wszystkich nowotworów złośliwych: raków, mięsaków, chłoniaków złośliwych, czerniaka, glejaków). Termin „carcinoma” oznacza natomiast raki czyli złośliwe nowotwory pochodzenia nabłonkowego. Określenie „rak nabłonkowy” jest zatem tautologią.

Doktorantka zaczerpnęła zdanie z pracy Torre i wsp.: Ninety percent of ovarian cancers (cancers = nowotwory złośliwe) are epithelial, the most common being serous carcinoma (carcinoma = złośliwy nowotwór pochodzenia nabłonkowego). Właściwe tłumaczenie: 90% nowotworów złośliwych jajnika ma pochodzenie nabłonkowe, zaś wśród nich najczęstszy jest rak surowiczy. To zdanie zostało błędnie przetłumaczone: „Rak nabłonkowy jest jednym z najczęstszych typów i stanowi około 90% diagnozowanych przypadków raka jajnika”. (Dla wyjaśnienia – pozostałe 10% nowotworów złośliwych jajnika, określanych jako „non-epithelial cancers”, to heterogenna grupa nowotworów - zarodkowych, z komórek płciowych, ze sznurów płciowych, z komórek ziarnistych, z komórek Sertoliego czy Leydiga, mięsaków, itp.). Kolejny przykład nieprawidłowej terminologii znalazłam na str. 5: „[...] w leczeniu zaawansowanej nabłonkowej postaci raka jajnika”.

Wymieniając najczęstsze typy histologiczne raków jajnika Autorka zapomniała wymienić raki jasnokomórkowe (clear cell carcinoma), które stanowią ok. 10% rozpoznań.

W kolejnym akapicie Omówienia Doktorantka podaje błędną informację: „około 5% chorych na nowotwór jajnika umiera”. Jeżeli, jak się domyślam, chodzi tutaj o raki jajnika, to 5-cio letnie przeżycie wynosi ok. 50%, czyli można przyjąć, że 50% pacjentek umiera (w ciągu 5 lat od diagnozy).

W kolejnych zdaniach Autorka charakteryzuje wzór przerzutowania raka jajnika, niestety również niezbyt trafnie, nie wspominając w ogóle o tym, że rak jajnika szerzy się głównie

poprzez tzw. wszczepy w jamie otrzewnej, w sieci większej (omentum majus) i na powierzchni narządów miednicy mniejszej i brzucha, zaś w znacznie mniejszym stopniu drogą limfatyczną i zupełnie marginalnie drogą krwionośną. Praca źródłowa, na której Doktorantka się oparła została wybrana dość przypadkowo; jest to chińska praca (Deng i wsp., 2018), która skupia się na analizie przeżycia pacjentek zdiagnozowanych w stadium IV wg. FIGO, w zależności od lokalizacji odległych przerzutów. Również, gdyby przeczytać dokładnie tę pracę, to znajdziemy tam informację: The most common sites of metastatic ovarian cancer include peritoneum, liver and lymph nodes. Occasionally, distant sites such as bone and brain may be involved.

Kolejny akapit dotyczy metod leczenia raka jajnika. Należy tutaj zauważyć, że zalecanym schematem leczenia u pacjentek z zaawansowanym rakiem jajnika (FIGO III-IV) jest pierwotna operacja cytoredukcyjna (ang. upfront surgery) i późniejsza chemioterapia (standardowo 6 cykli chemioterapii w oparciu o pochodne platyny i taksany). Natomiast schemat, który Autorka przytacza jako „powszechnie stosowaną metodę”, tj. chemioterapia neoadjuwantowa (ang. neoadjuvant chemotherapy, NACT) i odroczonej operacji cytoredukcyjnej (ang. interval debulking surgery, IDS) jest stosowany tylko u tych pacjentek, u których przewiduje się brak możliwości całkowitej cytoredukcji w czasie pierwotnej operacji. W każdym przypadku celem operacji jest całkowita cytoredukcja (brak makroskopowych zmian chorobowych), gdyż tylko całkowita cytoredukcja zwiększa czas przeżycia. Dobrym źródłem wiedzy w tym zakresie są rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologii Onkologicznej (PTGO) i ESGO (European Society of Gynecological Oncology), te drugie, w tłumaczeniu na język polski, również do znalezienia na stronie internetowej PTGO.

Terapie antyangiogenne (bewacyzumab) są już obecnie standardowo stosowane w leczeniu chorych w stadium FIGO IV oraz u pacjentek z niekompletną cytoredukcją, a także w leczeniu podtrzymującym (maintenance therapy), co wydłuża czas do progresji (ang. progression free survival, PFS) i całkowity czas przeżycia (ang. overall survival, OS). Zarówno w Omówieniu, jak i we wstępie do pracy nr 1, znajdujemy informację, że terapie antyangiogenne są (dopiero) przedmiotem badań klinicznych. Doktorantka w ogóle nie wspomina o inhibitorach PARP, które są obecnie standardowo stosowane w leczeniu podtrzymującym (olaparyb) u pacjentek z zaburzeniami rekombinacji homologicznej i stanowią przełom w terapii, dając wydłużenie PFS o ponad 3 lata w porównaniu do grupy placebo (badanie kliniczne SOLO1).

Kolejny akapit poświęcony jest nowotworowym komórkom macierzystym (ang. cancer stem cells, CSC). W tym miejscu brakuje mi dyskusji zagadnienia dotyczącego markerów nowotworowych komórek macierzystych w raku jajnika. Według mojej wiedzy, nie ma obecnie konsensusu naukowego co do zestawu markerów charakteryzujących CSC w raku jajnika. W szczególności marker CD44 jest raczej markerem korelującym ze złym rokowaniem, niż markerem macierzystości. Tym bardziej wobec faktu, że zarówno w ustalonych liniach komórkowych (np. ES2), jak i w preparatach pooperacyjnych odsetek komórek CD44+ może sięgać powyżej 90%. Wiele wskazuje na to, że fenotyp CSC jest zmienny, a także występuje zjawisko plastyczności fenotypowej – komórki guza mogą dynamicznie uzyskiwać fenotyp macierzysty oraz go tracić [5,6].

Na zakończenie muszę dodać, że trochę zaskakujący jest dla mnie tytuł rozprawy doktorskiej. O ile w tytułach prac oryginalnych wchodzących w skład rozprawy mowa jest o „pierwotnych i ustalonych liniach komórkowych raka jajnika” lub „komórkach raka jajnika”, to w tytule rozprawy mowa jest o „komórkach macierzystych raka jajnika”. W mojej opinii właściwsze byłoby pozostanie przy wyjściowym określeniu „komórki raka jajnika”. Pomimo wykazania, że użyte w badaniach komórki ekspresują (w różnym stopniu i w różnym składzie) niektóre z białek uznawanych za potencjalne markery CSC, nie możemy uznać, że mamy do czynienia (wyłącznie?) z CSC raka jajnika. Nie wydaje się również, aby terapia za pomocą mikropęcherzyków powodowała swoisty efekt w odniesieniu do komórek macierzystych raka jajnika. W pracy nr 1 wykazano bowiem, że traktowanie MV nie miało wpływu na ekspresję

białek powierzchniowych uznawanych za markery nowotworowych komórek macierzystych (CSC) ani mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC). Jeżeli Doktorantka nie zgadza się z moją oceną, prosiłabym, aby w czasie obrony spróbowała obronić tezę, że jej badania wykazały wpływ MV na komórki macierzyste raka jajnika.

Podsumowanie

Praca doktorska mgr Szyposzyńskiej obejmuje obszerny cykl doświadczeń, opublikowany w postaci cyklu trzech prac oryginalnych w recenzowanym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym - International Journal of Molecular Sciences (MDPI) w latach 2020, 2023 i 2024. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem i ma udokumentowany oświadczeniami współautorów wiodący wkład pracy w powstanie tych publikacji.

Prace te wykorzystują interesujący i złożony układ badawczy: mikropęcherzyki izolowane z mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej, komercyjnie dostępne linie komórkowe raka jajnika, pierwotne komórki nowotworowe jajnika wyizolowane z materiału klinicznego, oraz dwie wyprowadzone w ramach niniejszej pracy unieśmiertelnione linie komórkowe raka jajnika. W tym złożonym układzie wykonano wszechstronne badania wpływu MV na komórki raka jajnika. Szczególnie cenne wydaje mi się wyprowadzenie linii komórkowej OvCa7AhTERT, którą warto byłoby przekazać do ogólnodostępnych repozytoriów komórkowych, aby inne zespoły badawcze mogły ją wykorzystywać do dalszych badań.

Warto dodać, że Doktorantka ma na swoim koncie znaczący dorobek pięciu artykułów oryginalnych, a także udział w realizacji dwóch projektów badawczych (jeden finansowany z funduszy UE, drugi przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej) oraz zaangażowanie w popularyzację nauki (warsztaty w ramach Festiwalu Nauki, wykład w liceum).

W mojej opinii, rozprawa doktorska znakomicie wypełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, z późniejszymi zmianami (tj. Dz. U. z 2023 r. poz. 742z późniejszymi zmianami), dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda o dopuszczenie mgr Agnieszki Szyposzyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Katarzyna Lisowska

Narodowy Instytut Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie PIB, Oddział w Gliwicach

1. Beaufort CM, et al. Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes. PLoS One. 2014 Sep 17;9(9):e103988. doi: 10.1371/journal.pone.0103988.
2. Anglesio MS, et al. Type-specific cell line models for type-specific ovarian cancer research. PLoS One. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0072162
3. Domcke S, et al. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. Nat Commun. 2013;4:2126. doi: 10.1038/ncomms3126.
4. Tudrej P et al. Characteristics of in vitro model systems for ovarian cancer studies. Oncol. Clin. Pract. 2019;15:246–259. doi: 10.5603/OCP.2019.0024.
5. Kenda Suster N, Virant-Klun I. Presence and role of stem cells in ovarian cancer. World J Stem Cells. 2019 Jul 26;11(7):383-397. doi: 10.4252/wjsc.v11.i7.383.
6. Motohara T, et al. The hallmarks of ovarian cancer stem cells and niches: Exploring their harmonious interplay in therapy resistance. Semin Cancer Biol. 2021 Dec;77:182-193. doi: 10.1016/j.semcancer.2021.03.038.