

Warszawa 18.06.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

**„The influence of tumor microenvironment on the activity and gene
expression profile of organospecific endothelial cells”**

Autor: Kinga Wilkus

Guz nowotworowy jest zbudowany z wielu różnych typów komórek, z których jedynie pewna część ma wpływ na wzrost i agresywność guza. Guz jest bowiem wynikiem tworzenia się struktury wieloskładnikowej na którą składają się komórki wielu typów. Do tej kategorii należą przede wszystkim komórki tworzące monowarstwę zbudowaną z komórek śródbłonka wyściełającego naczynia, którymi transportowane są płyny ustrojowe takie jak krew lub chłonka. Śródbłonek odgrywa bardzo ważną rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu. Nie jest jednak zbiorem jednorodnych komórek. Poza komórkami wyściełającymi cały układ naczyniowy komórki śródbłonka są zróżnicowane fenotypowo z takimi procesami jak organospecyficzność, progresja guza, jego agresywność czy tworzenie sieci naczyń krwionośnych i/lub limfatycznych. Heterogenność komórek śródbłonka może ewoluować na wiele różnych sposobów. Ocena wpływu heterogenności na środowiska guza nie jest jednak łatwa. Dlatego często w miejsce dokładniejszej oceny uwzględnia się tzw. skumulowany efekt mikrośrodowiska. Pozwala on w sposób niedoskonały uwzględnić efekt wpływu na to co dzieje się w guzie i jego otoczeniu, a także uwzględnić różne stany patologiczne. Współdziałanie między guzem nowotworowym i odpowiednio przekształconymi komórkami śródbłonka prowadzi do powstania komórek epitelialnych zdolnych do inicjacji procesu angiogenezy. Z punktu widzenia nowotworu krytyczny wydaje się rozwój w kierunku funkcjonalnych komórek endotelialnych tworzących nieprawidłowe unaczynienie. Komórki

endotelialne uczestniczą w procesie tworzenia nie w pełni funkcjonalnych naczyń którymi organizm dostarcza guzowi pożywienie i odpowiednią ilość tlenu. Tworzące się unaczynienie charakteryzuje się wzrostem usieciowania oraz zwiększeniem przepuszczalności. Chcąc dokładnie uwzględnić wpływ unaczynienia na wzrost guza nowotworowego konieczne jest scharakteryzowanie właściwości komórek epitelialnych, aby ich biologia nie ulegała zmianom w trakcie ich obserwacji. W tym kontekście podjęcie tematyka pracy doktorskiej mgr Kingi Wilkus, która postanowiła podsumować stan obecnej wiedzy na temat roli jaką heterozmienność komórek śródbłónka odgrywa w rozwoju komórek guza wydaje się w pełni uzasadnione.

Przedstawiona praca doktorska została przygotowana jako zszywka z dwóch publikacji, które ukazały się w 2021 roku w języku angielskim w czasopiśmie *Journal of Molecular Sciences* (IF= 6,208). Pierwsza z tych prac to publikacja pogładowa, w której podsumowano wiedzę na temat różnych modeli, które są powszechnie stosowane nie tylko w badaniach nowotworów, ale także roli zmian patologicznych w komórkach endotelialnych indukowanych przez mikrośrodowisko. Autorka podkreśliła, że heterogenność komórek śródbłónka, a także duże różnice w spełnianiu przez nie różnorodnych funkcji są wynikiem wpływu różnych czynników poza- i śródkomórkowych ale także modyfikacji epigenetycznych i zmian biochemicznych. Druga, to praca oryginalna, w której autorka opisała wykorzystywane modele do analizy zmian jakie dokonują się w komórkach endotelialnych pobranych z guza raka piersi i z tkanki nienowotworowej od tej samej pacjentki w warunkach normoksji i hipoksji. Obie prace zostały pozytywnie zrecenzowane. W obu pracach Pani Kinga Wilkus była pierwszym lub równorzędnym pierwszym autorem.

Celem w tej pracy było podsumowanie wiedzy o modelach komórek endotelialnych, które są powszechnie wykorzystywane nie tylko w przypadku charakterystyki nowotworów, ale także w chorobach związanych z patologią komórek endotelialnych. Badanie miało na

celu zidentyfikowanie nowych cech które pozwolą na odróżnienie zdrowych ECs od ECs pochodzących z raka piersi

Doktorantka wykorzystując schemat opracowany i opatentowany w zespole prowadzonym przez prof. Kieda wyprowadziła dwie linie komórek nabłonkowych wyizolowane: pierwsza z raka piersi (HBCa.MEC) i druga z tkanki prawidłowej piersi (HBC.MEC). W wyniku stosowanej procedury obie linie posiadały identyczny zestaw markerów charakterystyczny dla komórek nabłonkowych z tym, że komórki izolowane z guza charakteryzowały się niższym poziomem ich ekspresji. Porównanie obu tych linii pozwoliło na ocenę wpływu angiogenezy na proliferację komórek EC, oraz roli komórek epitelialnych w tworzeniu naczyń. Zdrowe komórki nabłonkowe (EC) pochodzące ze zdrowej piersi cechowała większą zdolność do proliferacji niż komórki nabłonkowe pochodzące z guza. Cechował je także niższy poziom białka BCL6 – negatywnego regulatora apoptozy. Poziom białka TP53 wykazywał odwrotną tendencję. Chociaż obie linie były CD309+ to w linii HBCa.MEC naczynia powstawała szybciej, co odpowiada stwierdzeniu, że w linii wyprowadzonej ze zdrowej piersi poziom CD309+ był wyższy. Oba te wyniki potwierdzały zmiany w zdolnościach proangiogennych.

Doktorantka wykazała, że w komórkach epitelialnych wyizolowanych zarówno z tkanki guza piersi jak i z tkanki prawidłowej piersi tej samej pacjentki cechuje zmienność. Zjawisko to jest wynikiem wpływu pozostałych elementów determinujących mikrośrodowisko takich jak zróżnicowany poziom proliferacji, warunki hodowli, morfologia czy organospecyficzność. Innymi słowy przy tworzeniu modeli ważne jest aby charakterystyka komórek epitelialnych funkcjonalnie wyprowadzonych z danego organu uwzględniała zarówno zmienność jak i wpływ cech zdeterminowanych mikrośrodowiskiem. W przeciwnym wypadku badania obarczone będą błędem.

Doktorantka przeprowadziła analizę porównawczą dla obu wyizolowanych linii komórkowych. Po wielu pasażach komórki prezentowały fenotyp charakterystyczny dla

komórek epitelialnych chociaż ich charakterystyka pod względem biologicznym wykazywała znaczące różnice. Dodatkowo obie linie wykazywały ekspresję markerów takich jak ACE i CD105 charakterystycznych dla ludzkich komórek śródbłónka obserwowane przez innych autorów. Obie linie EC prezentowały markery zróżnicowanych komórek śródbłónka takich jak VWF, CD31. Jednocześnie linie komórkowe były ujemne dla takich markerów jak CD34 i dodatnie dla CD133. Obie linie komórkowe wykazywały wyższy poziom ekspresji PDPN, EGFR i AP dla EC wyprowadzonej ze zdrowej tkanki. Wpływ mikrośrodowiska na wydzielanie VEGF-A oceniano w warunkach normoksji i hipoksji. W obu liniach w warunkach hipoksji obserwowano wzrost ekspresji tego markera. W warunkach normoksji, w linii EC izolowanej z guza poziom ekspresji VEGF-A ulegał obniżeniu.

Doktorantka wykazała też zdolność do tworzenia tubul przez obie linie. W przypadku linii izolowanej z tkanki guza usieciowanie osiągnięto wcześniej, rurki nie były prawidłowo uformowane. Zdrowe EC wykazywały lepsze usieciowanie i wyższą liczę połączeń w porównaniu do komórek izolowanych z guza. Marker skutecznej angiogenezy – CD309+ obserwowano w obu liniach EC. W normoksji poziom receptora czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego był wyższy w zdrowych EC.

Aby ocenić wpływ obserwowanych zmian na poziom ekspresji genów, analizie poddano transkryptomy prawidłowej i nowotworowej EC. Dane z NGS wykazały wzrost poziomu ekspresji 350 genów i spadek poziomu ekspresji 396 genów. Doktorantka wybrała 10 genów o największych różnicach w poziomie ekspresji między EC izolowanymi ze zdrowej tkanki w porównaniu do linii wyizolowanej z nowotworowych EC. Wśród nich kilka, których produkty były charakterystyczne dla komórek EC. Oprócz białek specyficznych dla EC obie linie komórkowe wykazywały obecność PDPN. Ekspresja Epfryny B2 pozwala na stwierdzenie, że obie linie ECs wywodzą się z tętnic, oraz że obecność tego markera związana jest ze złym rokowaniem. Patologiczne komórki endotelialne cechuje zwiększony poziom markerów mezenchymalnych (SMA). Zwiększona ekspresja SMA związana jest także ze

wzrostem agresywności guza. Co ciekawe wśród 10 wybranych genów różniących się poziomem ekspresji doktorantka obserwowała zwiększony poziom ekspresji białka ABCG2. Zmieniony poziom ekspresji markerów w co najmniej kilku genach wyodrębnionych za pomocą NGS jest również obecny w innych typach nowotworów takich jak czerniak czy raku płuca, jajnika i przewodowym raku piersi. Najwyraźniej EC pochodzące z guza wykazują ekspresję genów charakterystyczną zarówno dla prawidłowego śródbłonka, jak i komórek pochodzących z raka.

W dyskusji doktorantka kolejno omawia uzyskane wyniki i porównuje je z danymi literaturowymi. Dyskusja poprowadzona jest ciekawie. Autorka stara się podkreślić te z ustaleń, które jej zdaniem mogą mieć znaczenie w kontekście klinicznym. Podsumowując, mgr Kinga Wilkus osiągnęła stawiane sobie cele. Wyizolowała dwie linie ECs, które prezentowały główne markery komórek śródbłonka VWF i CD31. Charakterystyczny wzór ekspresji był reprezentatywny dla komórek epitelialnych. Obie linie komórkowe były zdolne do tworzenia naczyń *in vitro*, ale efektywność tego procesu była uzależniona od ich pochodzenia. Linia wyizolowana z guza wykazywała niższy potencjał angiogeny niż linia wyprowadzona ze zdrowej tkanki piersi. Niektóre z cech charakterystyczne dla nowotworowych EC mogły ulec modyfikacji podczas długotrwałej hodowli. W tym kontekście ekspozycja na warunki (hipoksja/normoksji) wydaje się mieć krytyczne znaczenie ujawniające dalsze różnice między liniami komórkowymi. 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). Dlatego wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie autorki pracy mgr Kingi Wilkus do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo chciałbym wnioskować o wyróżnienie tej pracy gdyż moim zdaniem autorce udało się utrzymać hodowlę na wczesnym etapie przypominającym hodowlę pierwotne, a to z kolei stwarza szansę na wyodrębnienie zmian bezpośrednio prowadzących do indukcji angiogenezy.