

Gniezno, 13 września 2018 roku

dr hab. n. med Dawid Murawa

Katedra Chirurgii i Onkologii

Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu

Uniwersytet w Zielonej Górze

Ocena rozprawy doktorskiej lek. med. Izabeli Zaleśnej

pt.: „Zależność fenotypu komórek czerniaka w hodowlach in vitro od czynników wzrostu”.

Praca liczy 123 strony maszynopisu, zawiera 11 rycin, 6 tabel i znaczną liczbę nowoczesnego piśmiennictwa. Jej układ redakcyjny jest poprawny. Zawiera rozdziały: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo, streszczenie w języku polskim i angielskim. Na początku dysertacji doktorantka przedstawiła listę swoich publikacji oraz komunikatów zjazdowych.

Zachorowalność na nowotwory złośliwe na świecie zmienia się na przestrzeni lat, ale czerniak skóry szczególnie w ostatnich dekadach jest coraz częstszym problemem w onkologii. W Polsce odnotowuje się obecnie prawie 3tys. zachorowań na czerniaka skóry każdego roku. Polska należy do krajów o średniej zachorowalności na ten nowotwór. W latach 1980-2010, liczba zachorowań zwiększyła się niemal 3-krotnie. Do znanych czynników rozwoju czerniaka należą zarówno czynniki genetyczne, jak i wpływ środowiska. Najczęściej jednak jest to kombinacja obu tych czynników. Za

najważniejszy czynnik ryzyka rozwoju czerniaka uważa się ekspozycję na promieniowanie UV. Promieniowanie UVA to indukowanie wolnych rodników tlenowych, promieniowanie UVB to mutagenne działanie na DNA skutkujące nagromadzeniem zmian genetycznych prowadzących w konsekwencji do rozwoju komórek czerniaka. Oczywiście wiele dodatkowych czynników może ułatwiać niekorzystny wpływ promieniowania UV – fenotyp skóry, poparzenia słoneczne, sposób korzystania ze słońca, solaria. Mimo stałego trendu wzrostowego zachorowalności na ten nowotwór w wielu krajach uzyskano spadek umieralności z powodu czerniaka. Oczywiście podkreśla się tutaj przede wszystkim rolę wzrostu świadomości społecznej dzięki licznym akcjom realizowanym między innymi przy udziale świata mediów. Poprawa wyników leczenia to wreszcie także postęp dokonujących się w naszej codziennej pracy: chirurga onkologa, radioterapeuty czy onkologa klinicznego.

Oczywiście podstawowe leczenie czerniaka skóry to postępowanie chirurgiczne – szerokie wycięcie blizny po zdiagnozowanym czerniaku oraz biopsja węzła wartowniczego, czy też w określonych sytuacjach limfadenektomia regionalnego spływu chłonnego. W świetle obecnej wiedzy nie ma wskazań do rutynowego stosowania leczenia uzupełniającego w postaci leczenia systemowego u chorych po radykalnym leczeniu chirurgicznym. W IV stopniu zaawansowania tak jak w każdym nowotworze rokowanie jest złe. 5-letnie przeżycia w czerniaku wynoszą około 10%. Wiadomo, iż zarówno chemioterapia jak i badane przez lata szczepionki nie przyniosły pokładanych w nich oczekiwań. Obiektywna odpowiedź na chemioterapię

nie przekracza 10%. Współczesne leczenie czerniaka w ostatnich latach to hamowanie indukowanych wskutek mutacji określonych szlaków sygnałowych.

Czerniak to nowotwór wysoce immunogenny. Stąd intensywne badania szeroko pojętej immunologii w czerniaku. Ważnym czynnikiem prognostycznym w rozwoju czerniaka jest infiltracja guza nowotworowego przez komórki limfocytów T CD8 cytotoksycznych, których zadaniem jest aktywacja w komórkach szlaków apoptotycznych oraz limfocytów T CD4 odpowiadających za prezentację antygenów komórkom APC. Na bazie powyższych informacji w latach 2011-2014 zarejestrowano pierwsze 3 leki, przeciwciała: ipilimumab, niwolumab oraz pembrolizumab.

To ważne, że we wstępie dysertacji przedstawiono w sposób przejrzysty kolejno problemy kliniczne i zasady leczenia czerniaka skóry, znaczenie immunoterapii, znaczenie określonych szlaków sygnałowych RAS/RAF/MEK/ERK w terapiach celowanych, mechanizmy oporności oraz znaczenie mikrośrodowiska dla rozwoju oporności komórek czerniaka. Czuję satysfakcję, iż doktorantka zwraca tak szeroko uwagę na możliwości leczenia celowanego, szczególnie co zgodne z dzisiejszą wiedzą w zakresie mutacji BRAF^{v600E} i w dalszej części wstępu inhibitorów kinaz MEK1/2. W podrozdziale „Terapie skojarzone z użyciem leków celowanych” zwraca doktorantka uwagę na problem oporności. Podaje przykłady łączenia leków celem zmniejszenia powyższego problemu: wemurafenib z kobimetynibem oraz dabrafanib z trametinibem. Skuteczność terapii celowanych, skojarzonych podaje na przykładzie dostępnych w literaturze badań klinicznych. W rozdziale 7 bardzo dokładnie omówione zostały mechanizmy oporności na terapie ukierunkowane przeciw elementom szlaku RAS/RAF/MEK/ERK. Udowodniono, iż w przypadku czerniaka

mechanizmy oporności wyglądają inaczej niż w przypadku terapii celowanych innych nowotworów. W przypadku inhibitorów BRAF najczęstszym mechanizmem oporności jest ominięcie blokowanego terapią białka przez aktywację innych elementów danego szlaku lub aktywację innego szlaku sygnałowego. Liczba poznanych mechanizmów rozwoju oporności na leki celowane w czerniaku ciągle rośnie. W bardzo przejrzysty sposób mechanizmy oporności na terapie celowane w czerniaku przedstawia rycina 2. W rozwoju oporności na terapie celowane w czerniaku na podstawie badań ostatnich lat coraz więcej uwagi poświęca się wpływowi mikrośrodowiska na ten proces poprzez różne czynniki wydzielane autokrynnie i parakrynnie. Mikrośrodowisko skóry i melanocytów tworzą melanoblasty, keratynocyty, komórki śródbłonna, fibroblasty oraz komórki układu odpornościowego. Wzajemne oddziaływanie tych elementów decyduje o prawidłowym funkcjonowaniu melanocytów. Doktorantka przedstawia liczne wyniki badań w tym temacie. Co słuszne i znajdujące dalej odzwierciedlenie w części badawczej pracy badanie komórek czerniaka szczególnie w kontekście odpowiedzi na leki wymaga zastosowania w badaniach *in vitro* metod, które najlepiej odzwierciedlałyby warunki panujące *in vivo*.

Cele recenzowanej pracy zostały przedstawione w 4 punktach. Zasadniczym założeniem i celem pracy było zweryfikowanie hipotezy, iż zastosowanie różnych czynników wzrostu w podłożu hodowlanym wpływa na zmianę fenotypu komórek nowotworowych i dalej na ich odpowiedź na zastosowane leki celowane.

W badaniach wykorzystano dwa leki: Wemurafenib oraz Trametinib. Badaniem objęto linie komórkowe DMBC wyprowadzone z fragmentów guzów chorych leczonych z

powodu czerniaka. Komórki po 7 dniach hodowli z odpowiednimi czynnikami wzrostu zostały poddane działaniu badanych leków. Oceniano przeżywalność populacji komórek oraz ich morfologię. Analizowano także ekspresję i aktywność wybranych białek wewnątrzkomórkowych w wykorzystaniem techniki Western blot.

Pobranie próbek tkankowych wykonano od 36 chorych. Natomiast otrzymano 11 stabilnych linii komórkowych (współczynnik powodzenia 30%). Wyniki pracy zostały przedstawione w dwóch częściach klinicznej oraz doświadczalnej. W części klinicznej doktorantka omówiła po kolei, dokładnie pochodzenie wszystkich linii komórkowych. Pozwolę sobie tutaj na dygresję niezwiązaną z samą pracą doktorską. U większości chorych brakuje informacji o ich dalszych losach, brak zgłoszenia się do określonej Poradni kończy drogę chorego. Jako recenzent wielokrotnie spotykam się z tym problemem. Świadczy to o słabościach w systemie opieki zdrowotnej i braku sprawnego przepływu informacji o chorych.

W części doświadczalnej doktorantka kolejno przedstawia wyniki oceny wpływu czynników wzrostu bFGF, EGF, HGF na morfologię komórek czerniaka. Czynniki te stosowane były samodzielnie lub w skojarzeniu. Nie stwierdzono wpływu czynników wzrostu na morfologię komórek czerniaka żadnej z badanych linii. W dalszym etapie oceniano odpowiedź powyższych linii komórkowych na wemurafanib oraz trametinib. Stwierdzono tutaj różnice pomiędzy liniami komórkowymi. Największy spadek proliferacji komórek czerniaka był widoczny w liniach DMBC12 i 21. Kolejną część wyników to ocena aktywności białek różnych szlaków sygnałowych poddanych działaniu czynników wzrostu oraz inkubacji z wemurafenibem i trametinibem. Inkubacja z wemurafenibem oraz trametinibem spowodowała istotne obniżenie

poziomu aktywnych białek ERK1/2 we wszystkich badanych liniach komórkowych. Oba leki hamowały szlak sygnałowy RAS/RAF/MEK/ERK w badanych liniach komórkowych czerniaka. Efekt ten był niezależny od rodzaju czynników wzrostu zastosowanych w podłożu hodowlanym. Kolejny ważny dla rozwoju i progresji komórek czerniaka szlak to kanoniczny szlak WNT. Badania w tym temacie wykazały znaczne różnice pomiędzy liniami komórkowymi. Podobnie w przypadku badania aktywności czynnika transkrypcyjnego NFkappaB.

Biorąc pod uwagę brak znaczących różnic między efektami stosowania leków w komórkach hodowanych w podłożu z różnymi czynnikami wzrostu w ostatniej części pracy postawiono pytanie czy brak czynników wzrostu wpłynie na morfologię komórek czerniaka oraz poziom aktywnych form ERK1/2, beta kateniny i NFkappaB. Stwierdzono brak takowych różnic. Kolejnym etapem było porównanie efektów działania wemurafenibu i trametinibu na komórki czerniaka, które hodowano w podłożu z lub bez czynników wzrostu. W przeprowadzonej analizie komórki czerniaka wykazują zbliżony profil odpowiedzi na terapie celowane bez względu na obecność egzogennych czynników wzrostu w podłożu hodowlanym. Całość wyników doktorantka uzupełniła bardzo czytelnymi wykresami oraz rycinami. Na tym etapie muszę stwierdzić, iż wyniki zostały przedstawione w sposób bardzo czytelny i zrozumiały także dla osób na co dzień zajmujących się pracą kliniczną, a nie szeroko pojętymi naukami podstawowymi. Ten fakt bardzo cieszy!

Powyższe wyniki poddane zostały dyskusji. W pierwszej części doktorantka przedstawia zmiany jakie zaszły w leczeniu systemowym czerniaka w ostatnich latach. Olbrzymi postęp i nadzieja dla coraz większej grupy chorych. Inhibitory BRAF,

MEK1/2, przeciwciała anty-CTLA-4, przeciwciała blokujące oddziaływanie receptorów PD-1 z jego ligandami PD-L1/L2 to spektrum dzisiejszych możliwości. Niestety w dłuższym okresie stosowania obserwuje się spadek skuteczności ich działania. Prowadzone są badania nad poszukiwaniem potencjalnych biomarkerów korelujących z dobrą bądź słabą odpowiedzią na terapię ukierunkowane molekularnie. Miałyby to na celu poprawę kwalifikacji chorych do określonego leczenia. Doktorantka szeroko omawia literaturę przedmiotu pokazując wielopunktowy problem oporności na terapię celowaną. Ciekawe jest cytowane badanie Bracher i wsp. Wyższy poziom czynnika wzrostu EGF korelował na przykład z obecnością mikroprzerzutów do węzłów wartowniczych. Biorąc to pod uwagę i stosując inhibitor EGFR wraz z inhibitorem kinazy BRAF obserwowano spadek proliferacji komórek opornych na inhibitory kinazy BRAF.

Aktywność szlaku RAS/RAF/MEK/ERK w komórkach czerniaka z mutacją BRAF wpływa nie tylko jednak na wzrost transkrypcji genów odpowiedzialnych za proliferację i migrację komórek ale oddziałuje także na inne szlaki sygnałowe w komórce, takie jak kanoniczny szlak WNT oraz szlak z udziałem czynnika transkrypcyjnego NFkappaB. Ten szeroki zakres zależności znalazł odzwierciedlenie w recenzowanej przeze mnie pracy doktorskiej. Gratuluję zatem tak dobrze dobranego „warsztatu badawczego”. W kolejnej części dyskusji doktorantka skupia się nad komentowaniem własnych wyników badań. Po raz kolejny zwraca uwagę na zastosowanie linii komórkowych wyprowadzonych z guzów czerniakowych pobranych od chorych. Badania były zatem próbą odwzorowania mikrośrodowiska guza w warunkach in vitro. Doktorantka zestawia własne uzyskane wyniki z danymi

literaturowymi. Przytacza ciekawe badanie Massi i wsp. gdzie wysoki poziom beta-kateniny koreluje z negatywną odpowiedzią na terapie celowane. W przedstawionej dysertacji komórki linii DMBC33 z wysoką podstawową aktywnością beta-kateniny nie odpowiadały indukcją apoptozy po zastosowaniu wemurafenibu i trametinibu. Całkowicie odwrotnie problem przedstawiał się w przypadku linii komórkowej DMBC21. Dla mnie jako klinicysty bardzo ważna jest tutaj informacja dotycząca właśnie losów chorej od której wyizolowano linię DMBC21. Odpowiedź na leczenie wemurafenibem trwająca 9 miesięcy czyli dłużej niż mediana.

Rozprawa kończy się 8 wnioskami, które w pełni wynikają z analizowanego materiału. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej negują postawioną hipotezę, że egzogenne czynniki wzrostu mają wpływ na modelowanie odpowiedzi komórek czerniaka na terapie ukierunkowane molekularnie. Jako recenzent mam nadzieję, iż doktorantka będzie kontynuowała ten kierunek badawczy. Poszukiwanie czynników mogących mieć wpływ na rodzaj, czas i zakres stosowanej terapii celowanej w czerniakach oraz przewidywanie indywidualnej, spersonalizowanej odpowiedzi na leczenie to przyszłość nowoczesnego leczenia onkologicznego.

Praca opatrzona została streszczeniami w języku polskim i angielskim.

Podsumowując, rozprawa doktorska lekarz Izabeli Zaleśnej przedstawia aktualny problem kliniczny i naukowy. Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani lek. Izabeli Zaleśnej pt. „Zależność fenotypu komórek czerniaka w hodowlach in vitro od czynników wzrostu” w pełni spełnia wymogi stawiane przez ustawodawcę rozprawom doktorskim.

Jednocześnie uważam, że Pani Izabela Zaleśna jest kandydatem spełniającym kryteria stawiane pracownikom naukowym ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Na tej podstawie stawiam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Łódzkiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie lek. Izabeli Zaleśnej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie przedstawionej dysertacji doktorskiej.

dr hab. n. med. Dawid Murawa
specjalista chirurgii ogólnej
onkologicznej
ul. Jana Błochwy 34
60-197 Poznań

dr hab. n. med Dawid Murawa

