



Prof. dr hab. Iwona Bogacka  
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt  
Wydział Biologii i Biotechnologii UWM  
10-718 Olsztyn  
ul. Oczapowskiego 1A

Olsztyn, 04.02.2021 r.

### Ocena rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Piaseckiej

pt. ” *Wpływ czynników prozapalnych mikrośrodowiska guza na indukcję fenotypu inwazyjnego komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego* ”

### OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana na wniosek Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Praca została wykonana pod opieką naukową Pani dr hab. n. med. Hanny Romańskiej-Knight, prof. UMED Łódź, z Zakładu Patologii Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Opracowanie obejmuje 137 stron maszynopisu, 34 ryciny, 3 tabele oraz blisko 200 pozycji piśmiennictwa anglojęzycznego. Zawiera typowe dla rozprawy doktorskiej rozdziały, a także streszczenie w języku polskim, angielskim oraz wykaz najczęściej stosowanych skrótów. Do pracy dołączono także kopię zgody Dyrektora Departamentu Ochrony Przyrody na użycie mikroorganizmów genetycznie modyfikowanych zaliczonych do II kategorii zagrożenia w zakresie prowadzonych badań oraz Uchwałę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi ze zgodą na prowadzenie eksperymentu medycznego, którego wyniki są prezentowane w niniejszej rozprawie. W pracy umieszczono informację, że część zawartych w niej wyników została opublikowana w 2020 roku w czasopiśmie *Neoplasia (Upregulation of HIF1- $\alpha$  via an NF- $\kappa$ B/COX2 pathway confers proliferative dominance of HER2-negative ductal carcinoma in situ cells in response to inflammatory stimuli*; IF=5,696). W pracy tej Doktorantka jest pierwszym autorem, a Jej udział polegał (zgodnie z opisem zawartym w publikacji) na analizie formalnej, prowadzeniu badań, przygotowaniu oryginalnej wersji pracy, walidacji, pozyskaniu finansowania. Badania do pracy doktorskiej zrealizowano w oparciu o środki finansowe pochodzące z dwóch projektów Narodowego Centrum Nauki (OPUS nr 2013/09/NZ4/02512 i PRELUDIUM nr 2018/29/N/NZ3/02407).

### SZCZEGÓŁOWA ANALIZA

Podjęte przez Doktorantkę badania miały na celu określenie udziału receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2) w odpowiedzi komórek raka przewodowego *in situ* (DCIS) na bodźce środowiska prozapalnego w warunkach *in vitro*, oraz zbadanie roli szlaku sygnałowego NF- $\kappa$ B/COX2–HIF1- $\alpha$  w stymulacji proliferacji oraz indukowaniu fenotypu inwazyjnego komórek DCIS w odpowiedzi na te bodźce. Cenne jest także przeprowadzenie

badania, których celem była weryfikacji wyników uzyskanych w badaniach *in vitro* w oparciu o materiał tkankowy pozyskany od pacjentek z DCIS.

Rak przewodowy *in situ* (DCIS) jest formą nieinwazyjną, charakteryzującą się szybką proliferacją komórek nabłonka przewodów ze wszystkimi cechami złośliwości, jednak bez oznak naciekania podścieliska. Mimo zaangażowania dużej grupy badaczy oraz wieloletnich intensywnych zmagani ukierunkowanych na poznanie mechanizmów molekularnych determinujących progresję nieinwazyjnej formy raka przewodowego piersi *in situ* (DCIS) do formy inwazyjnej (IDC), zagadnienia te wciąż nie są w pełni poznane. Nabywanie cech inwazyjnych przez komórki DCIS może być nie tylko uwarunkowane genetycznie, ale też w dużym stopniu wynikać z działania czynników prozapalnych wydzielanych przez komórki TIL, TIL i TAM, obecne w mikrośrodowisku guza (TME). Do istotnych czynników prognostycznych w raku piersi należy także status HER2. Wyniki wcześniejszych badań wskazują, że transformacja DCIS do IDC związana jest z utratą receptora HER2, a dominacja proliferacyjna HER2-ujemnego klonu heterogennej populacji komórek guza może stanowić kluczowy element tego procesu. Niemniej jednak mechanizmy te nie są w pełni opisane, a dane literaturowe czasami niespójne, dlatego badania podjęte przez Doktorantkę w proponowanym obszarze naukowym uważam za szczególnie pożądane i uzasadnione, a zagadnienia poruszane w pracy – za interesujące i aktualne. O tym, że badania są ważne i nowatorskie może również świadczyć fakt uzyskania finansowania z NCN na ich prowadzenie w ramach dwóch wymienianych wcześniej projektów, a częściowe wyniki – prezentowane w rozprawie – zostały już opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie.

W 20-stronicowym *Wstępie* pracy, Doktorantka w czterech podrozdziałach, w przejrzysty sposób prezentuje aktualny stan wiedzy na temat zagadnień będących przedmiotem Jej badań. W skrócie przedstawia dane dotyczące epidemiologii, etiopatogenezy, klasyfikacji oraz leczenia nowotworów piersi. Wyjaśnia możliwe mechanizmy odpowiedzialne za transformację nowotworów nieinwazyjnych DCIS do form inwazyjnych IDC, wskazując m.in. na współistnienie wielu subpopulacji komórek w DCIS i IDC, wykazujących wysoki stopień zróżnicowania pod względem genetycznym, fenotypowym czy też składu otaczającego podścieliska. Opisuje znaczenie HER2 w rozwoju i progresji nowotworów piersi. Charakteryzuje rolę mikrośrodowiska guza w rozwoju i fizjologii gruczołu piersiowego a także w progresji DCIS, uwzględniając istotne znaczenie komórek immunologicznych oraz aktywacji szlaku NF- $\kappa$ B/COX2–HIF1- $\alpha$ . *Wstęp* jest zakończony podrozdziałem *Cel projektu*, w którym Autorka prezentuje hipotezy badawcze i główne cele pracy. W mojej opinii, sformułowano je poprawnie i dodam, że zostały w pełni zrealizowane. W rozprawie wyodrębniono kolejno rozdziały 1 i 3, a zabrakło rozdziału 2.

Dwa, oddzielne, 7-stronicowe rozdziały *Materiały* oraz *Metody* obejmują czternaście stron pracy doktorskiej. W pierwszym z nich podano informacje o materiale doświadczalnym (tylko dla badań *in vitro*), odczynnikach, sprzęcie laboratoryjnym. Z kolei drugi rozdział zawiera opis metod badawczych stosowanych w ocenianej pracy. Wykorzystano w niej rozmaite techniki biologii molekularnej m.in. metodę transfekcji komórek za pomocą wektorów plazmidowych systemu retrowirusowego lub lentiwirusowego, a także elektroforezę SDS-PAGE, Western Blot, immunobarwienie, testy immunoenzymatyczne (ELISA) czy mikroskopię fluorescencyjną i konfokalną. Należy także podkreślić i docenić opanowanie różnych technik hodowli komórek *in vitro* (w systemie 2D i 3D), które z pewnością wymagały dużego nakładu pracy. Metody są nowoczesne i dobrze dobrane do założonych celów badawczych. Szeroki zakres badań, różnorodność technik i modeli eksperymentalnych w badaniach *in vitro* (linie komórkowe MB2,

MCF10A, THP-1) wskazują na duże umiejętności Doktorantki. Dobrym uzupełnieniem badań *in vitro* są wieloletnie badania kliniczne, a szczególnie ich wyniki, w analizie których Doktorantka aktywnie uczestniczyła.

Generalnie, ta część pracy została napisana poprawnie, ale pewne uwagi i sugestie nasunęły mi się po analizie tego rozdziału: 1/ W celu zwiększenia przejrzystości pracy, korzystnym byłoby umieszczenie informacji dotyczących: *i)* zasadności wyboru i charakterystyki poszczególnych linii komórkowych stosowanych w badaniach *in vitro* (podrozdział 5.1 w *Wynikach* oraz *Dyskusja*), *ii)* zasadności wyboru cytokin i innych czynników doświadczalnych, *iii)* opisu grup kontrolnych w przeprowadzonych doświadczeniach (podrozdział 5.4 w *Wynikach*), w jednym rozdziale *Metody*. Ponadto, przedstawienie przeprowadzonych doświadczeń w formie schematu zwiększyłoby przystępność opisu przebiegu badań. 2/ W podrozdziale 4.2, niejasny jest opis mieszaniny wektorów stosowanych do transfekcji poszczególnych rodzajów komórek. Na jakiej postawie je wybrano i w jakim układzie doświadczalnym stosowano? Wprawdzie, częściowe odpowiedzi na te pytania można wyłuskać w rozdziale *Wyniki* (str. 54, 77), ale pełne informacje powinny być umieszczone znacznie wcześniej, w metodyce. Brakuje również sprecyzowania, jakie komórki poddano transfekcji/infekcji i w jakiej koncentracji były hodowane w warunkach *in vitro*. Jasne i precyzyjne opisanie układu doświadczalnego uporządkowałoby te porozrzucane w różnych rozdziałach pracy informacje, co z pewnością ułatwiłoby analizę. W tym samym podrozdziale wspomniano również o wykorzystanym w sortowaniu komórek – wektorze pLVTHM, natomiast w kolejnym podrozdziale, poświęconym sortowaniu komórek transfekowanych, już o nim nie wspomniano. Wskazano, że wydajność procesu transfekcji oceniano przy pomocy metody Western Blot (w tekście bardzo różnie: Western Blotting/Western blot) lub mikroskopii fluorescencyjnej. O ile ryciny 4 oraz 21 przedstawiają wyniki Western Blot dotyczące, odpowiednio, obecności białek HER2 i HIF1- $\alpha$ , to nie znalazłam w pracy zdjęć z mikroskopii fluorescencyjnej na ten temat. Dodatkowo, aby uzyskać pełny obraz efektywności transfekcji, można było uwzględnić również ekspresję genów (stosując np. real time PCR). 3/ Sugerowałabym, aby w metodyce nie stosować „RPM” (czyli obroty na minutę) jako parametru wirowania – zdecydowanie właściwszym parametrem jest „RCF” lub „g”. 4/ Zabrakło podrozdziału opisującego zastosowane techniki mikroskopowe. 5/ W podrozdziale *Analiza statystyczna* zabrakło informacji na temat zastosowanych w analizie wariacji testów *post-hoc*. 5/ W opisie metod badawczych często posługiwano się określeniami potocznymi (tzw. slangiem laboratoryjnym), których należałoby unikać: np. „pożywka bezsurowicza” (lepiej: żywka bez dodatku surowic), „mutanty” (poprawnie: komórki transfekowane), „komórki odrywano” (lepiej: komórki usuwano), „bufor PBS z 0,1% Tweenem” (str. 51), „western blottingu” (str. 53); niefortunne są też określenia np. „aktywację programów macierzystości” (str. 32), „sprawdzanych zachowań komórkowych” (str. 49), „aktywacja szlaków sygnalizacyjnych od badanych cytokin” (str. 50), „hodowano w atmosferze wilgotnej” (str. 43), „stymulację cytokinami prozapalnymi (IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , CM M1)”; CM M1 nie jest cytokiną/cytokinami. Polikationowy polimer o nazwie „polybrene” (str. 44) ma odpowiednik polski „polibren”. Stwierdzono także błędy o charakterze redakcyjnym: „min.” [powinno być min (czas) w całej metodyce], str. 47 (powinno być „ko-hodowlach trójwymiarowych”), str. 52 (powinno być „wszystkie badania *in vitro*”), str. 95 (powinno być „makrofagów klasy M1”), str. 97 (powinno być „na sygnały”), str. 100 (powinno być „została dokonana”), str. 104 (powinno być „prowadzić do zahamowania”). 5/ Dlaczego w hodowlach *in vitro* stosowano zróżnicowane koncentracje komórek linii HB2 oraz MCF10A (odpowiednio:  $1 \times 10^3$  oraz  $1,5 \times 10^3$  w podrozdziale 4.9 lub  $10 \times 10^3$  i  $14 \times 10^3$  w podrozdziale 4.11) oraz różne czasy hodowli

(odpowiednio 8 oraz 10 dni, rozdział 4.9.)? Czy nie byłoby bardziej właściwe stosowanie podobnych układów w obu badanych liniach komórkowych?

Rozdział *Wyniki* został podzielony na cztery części i obejmuje on 42 strony tekstu, 2 tabele i 30 rycin, często złożonych z kilku wykresów lub zdjęć. W swojej pracy, Pani mgr Dominika Piasecka wykazała po raz pierwszy, że: *i*) stymulacja cytokinami prozapalnymi (IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ ) oraz kondycjonowaną pożywką, uzyskaną z makrofagów klasy M1 reguluje proliferację, wzrost w środowisku 3D w Matrigelu oraz inwazję komórek DCIS w sposób zależny od HER2; mianowicie HER2-ujemne komórki DCIS wykazują większe tempo proliferacji, wzrostu i inwazji w porównaniu z komórkami HER2-dodatnimi, *ii*) stymulacja cytokinami prozapalnymi (IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ ) oraz kondycjonowaną pożywką uzyskaną z makrofagów klasy M1 prowadzi do fosforylacji czynnika jądrowego NF $\kappa$ Bp65 w miejscu Ser 536, jego translokacji do jądra komórkowego, wzrostu poziomu białka COX-2 i HIF1- $\alpha$  w warunkach normoksji tylko w HER2-ujemnych komórkach DCIS. W nawiązaniu do uzyskanych wyników, stwierdzono także, że zmiany w analizowanych procesach w HER2-ujemnych komórkach DCIS zależne są od aktywacji szlaku NF $\kappa$ B/COX2-HIF1- $\alpha$ . Interesujące są również wyniki badań klinicznych, opublikowane we wspomnianej wcześniej pracy w czasopiśmie *Neoplasia*, polegające na ocenie nacieku komórek układu immunologicznego w guzach DCIS bez amplifikacji HER2. Wykazano, że nie istnieje związek pomiędzy komórkami TICC a aktywnością receptora HER2, natomiast analizy histologiczne potwierdziły w 9% przypadków występowanie grup komórek nowotworowych o większej złośliwości (tzw. „hot-spotów”), wykazujących aktywność HIF1- $\alpha$  w sąsiedztwie obszarów gęstego nacieku TICC, które były obecne prawie wyłącznie w HER2-ujemnych komórkach DCIS. Rozdział kończy *Podsumowanie*, w którym Autorka w pięciu punktach zawarła najważniejsze rezultaty swoich badań.

Mam również uwagi do tego rozdziału: 1/ W analizie wyników uzyskanych w badaniach klinicznych Doktorantka wskazuje, że ryciny nr 33 i 34 oraz tabele nr 2 i 3 zostały zapożyczone z publikacji Piasecka i wsp., 2020, natomiast nie wskazuje, że niektóre wyniki badań *in vitro* również zostały opublikowane w tej samej pracy. W mojej opinii ta informacja powinna być uwzględniona w przedłożonej do oceny rozprawie. 2/ Często mylące i niespójne są opisy uzyskanych różnic statystycznych w tekście, w podpisach rycin i na wykresach. Podam tylko jeden przykład, ale takich przypadków jest zdecydowanie więcej. Mianowicie, w tekście (str. 55) wskazano, że „stymulacja IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  prowadziła do indukcji albo hamowania proliferacji, odpowiednio komórek HER2-ujemnych i komórek HER-2 dodatnich obu linii komórkowych”. Z kolei, w podpisie ryciny 5 Autorka wskazuje, że „IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  indukują proliferację komórek HER2-ujemnych”, podczas gdy na rycinie zaznacza tylko hamowanie proliferacji komórek HER2-dodatnich. Ponadto, biorąc pod uwagę brak odpowiedzi komórek HER2-ujemnych linii MCF10A na badane cytokiny, podpis tej ryciny jest bardzo nieprecyzyjny. Moim zdaniem, chyba lepszym rozwiązaniem byłaby oddzielna prezentacja komórek HER2-ujemnych i HER-2 dodatnich (oddzielnie dla obu linii), a do zaznaczenia różnic statystycznych można było zastosować literki (gdy przeprowadzono analizę wariancji dla porównania więcej niż dwóch grup doświadczalnych) i gwiazdki (gdy przeprowadzono test t-studenta dla porównania dwóch grup eksperymentalnych). 3/ Mało precyzyjne i przekonujące są opisy poziomu białek analizowanych za pomocą metody Western Blot. Podam tylko jeden przykład, ale jest ich więcej. Podpis ryciny 16 wskazuje, że „IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  prowadzi do przyrostu COX-2 i HIF1- $\alpha$  w komórkach HER2-ujemnych”, jednak moja analiza reprezentatywnych blotów sugeruje, że ten wpływ wcale nie jest tak oczywisty i jest dosyć podobny w obu rodzajach komórek (HER2-ujemnych i HER2-dodatnich), zwłaszcza w przypadku działania TNF- $\alpha$ . Moje

wątpliwości budzi również rycina 17, która przedstawia wpływ cytokin na ilość białka CAIX w obu typach komórek. Wskazanie wielkości kD badanego białka ułatwiłoby analizę uzyskanych produktów i prawidłową interpretację wyników. Konieczne byłoby wykonanie analiz statystycznych, uwzględniając ilość białka referencyjnego, i zestawienie analizowanych wyników w kolumnach. Nie należy rozważać różnic w ilości białka, opierając się wyłącznie na reprezentatywnych blotach. Powinniśmy je raczej analizować w kategoriach obecności białka w badanym materiale biologicznym.

*Dyskusja* obejmuje 12 stron maszynopisu i zawiera omówienie uzyskanych wyników w świetle aktualnej literatury. W moim odczuciu jest wyczerpująca, chociaż jak wcześniej wspominałam, niektóre jej fragmenty można było z powodzeniem przenieść do wcześniejszych rozdziałów pracy. Proszę o zwrócenie uwagi na pierwszy akapit rozdziału (l. 8-11), który pozostaje nieco w sprzeczności z punktem drugim *Podsumowania*. Stwierdzono w nim, że środowisko prozapalne promuje proliferację i inwazję komórek HER2-dodatnich a nie HER2-ujemnych, jak wskazano w *Podsumowaniu*. Pracę kończą cztery wnioski, które syntetycznie podsumowują uzyskane przez Doktorantkę wyniki. Ponadto, Doktorantka cytuje liczne piśmiennictwo (blisko 200 pozycji), co pozwoliło wykazać się bardzo dobrą znajomością problematyki związanej z tematem przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Swoje uwagi i sugestie zawarłam po analizie każdego z rozdziałów. Na zakończenie swojej oceny prosiłabym Doktorantkę o odpowiedź, podczas obrony, na następujące pytanie: jaki problem badawczy, który wyłonił się z Pani badań, uważa Pani za najbardziej interesujący i zasługujący na wyjaśnienie w najbliższej przyszłości (dlaczego?).

## **PODSUMOWANIE**

W podsumowaniu, należy stwierdzić, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki istotnie wzbogacają wiedzę na temat mechanizmów regulujących progresję komórek DCIS w kierunku fenotypu bardziej inwazyjnego. Dostarczają nowych informacji o tym jak ważny jest wpływ bodźców środowiska prozapalnego – poprzez zależną od receptora HER2 aktywację szlaku sygnałowego NFkB/COX–HIF1- $\alpha$  – na aktywność proliferacyjną i inwazję komórek DCIS. Uzyskane wyniki podkreślają również, że heterogenność populacji komórek guza może mieć znaczenie w odpowiedzi komórek DCIS na czynniki prozapalne, a czynnik HIF1- $\alpha$  może odgrywać ważną rolę jako marker predykcyjny progresji choroby.

Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą z zakresu tematyki prowadzonych badań, bardzo dobrym opanowaniem warsztatu badawczego oraz znajomością wielu nowoczesnych metod badawczych. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można sądzić, że Doktorantka zdobyła niezbędne doświadczenie i umiejętności przydatne w przyszłej pracy badawczej. Część wyników została już opublikowana w czasopiśmie z IF wynoszącym blisko 6, co świadczy o dużej wartości naukowej prowadzonych badań. Mam nadzieję, że przedstawione powyżej uwagi i sugestie przydadzą się w przygotowywaniu kolejnych publikacji oraz w przyszłej pracy naukowej.

## **WNIOSEK KOŃCOWY**

Uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. *”Wpływ czynników prozapalnych mikrośrodowiska guza na indukcję fenotypu inwazyjnego komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego”* spełnia warunki określone w art. 13, Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i **zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu**

**Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie mgr Dominiki Piaseckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

*Łeeeee Beglu*