



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Pracownia Genetyki Molekularnej i Wirusologii

Kierownik

Prof. dr hab. HANNA ROKITA

6 października 2017 r.

### Recenzja

#### pracy doktorskiej lek. med. p. Katarzyny Brodowskiej pt „Drug repositioning in ocular cancers treatment”

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej dotyczy poszukiwań nowych metod leczenia trzech najczęstszych złośliwych nowotworów oka – siatkówczaka, czerniaka naczyńiówki i glejaka złośliwego nerwu wzrokowego. Autorka rozprawy wprowadziła znaną już metodę repozycji leków, czyli użycia znanych leków stosowanych w leczeniu konkretnych chorób do badania zahamowania wzrostu i wielu innych parametrów, w tym molekularnych, trzech wymienionych nowotworów. Leki te, to trzy związki niebędące chemioterapeutykami: AICAR, lek stosowany u pacjentów po zawale serca w celu poprawy wydolności serca, metformina – lek przeciwcukrzycowy i werteporfina (VP) bez aktywacji światłem, która jest aktywowana światłem w terapii fotodynamicznej stosowanej w leczeniu zwyrodnienia plamki ocznej. Wyniki tych badań przedstawione w rozprawie są cenne, gdyż uzyskano je nie tylko w warunkach *in vitro*, ale i *in vivo* u myszy z obniżoną odpornością. Przedstawione wyniki zostały opublikowane w latach 2013-17 w postaci sześciu oryginalnych prac, spośród których w trzech p. Brodowska jest pierwszym autorem i w których Autorka rozprawy (co potwierdza także jej amerykański promotor, dr Demetrios Vavvas) określa swój udział jako wiodący (dwie publikacje - 85%) lub mniejszy – 45% i 40% oraz dwie publikacje z udziałem po 15%. Czasopisma, w których opublikowano wyniki, to Int J Oncol, Exp Eye Res, Plos One, Investigative Ophthalmology and Visual Science oraz Sci Rep (sumaryczny IF ok. 22). Prace te cytowane były już 113 razy (bez autocytowań) a indeks H wynosi 5. Publikacja w Exp Eye Res z 2014 r., w której p. Brodowska jest pierwszym autorem, zawierająca wyniki nt wpływu werteporfiny na komórki siatkówczaka w warunkach *in vitro*, była już cytowana 40 razy.

Rozprawa doktorska Pani Katarzyny Brodowskiej zawiera dość krótki 8-stronicowy „Wstęp” przedstawiający podejście lecznicze w postaci repozycji leków ilustrowane kilkoma przykładami jak chociażby ten

dotyczący nelfinawiru, kompetycyjnego inhibitora proteazy aspartylowej wirusa HIV stosowanego w leczeniu pacjentów z zakażeniem HIV, który okazał się nowym lekiem przeciwnowotworowym skutecznym w leczeniu raka prostaty. Te wyniki świadczą o celowości stosowania repozycji leków w poszukiwaniu nowych rozwiązań terapeutycznych. We wstępie opisano także dotychczasowe zastosowania trzech badanych leków w tym ich opisany w nielicznych pracach udział w leczeniu chorób nowotworowych. Wreszcie opisano krótko trzy wybrane do badań złośliwe nowotwory oka uwzględniając aktualne postępy w ich leczeniu. Pani Brodowska wybrała trzy wspomniane wyżej leki, których efekty opisane w dostępnym piśmiennictwie były wyraźnie zależne od typu nowotworu oraz słabo opisane w nowotworach oka.

Rozdział „**Materiały i metody**” jest przedstawiony na 17 stronach; zawiera opisy stosowanych materiałów i metod. Listę stosowanych w western blot przeciwciał pierwszorzędowych (prawie trzydzieści), skład stosowanych buforów, listę użytych linii komórkowych oraz listę pierwszo- i drugorzędowych przeciwciał stosowanych w metodzie immunohistochemicznej przedstawiono w postaci tabeli 1-4. Zastosowano standardowe metody izolacji i ilościowej analizy RNA i białek, takie jak odpowiednio ilościowy RT-PCR i western blot. Cytometria przepływowa została użyta do pomiaru żywotności komórek (ta także mierzona testem z MTT i z błękitem trypanu) i etapów cyklu komórkowego. Test tworzenia kolonii i krzywe wzrostu komórek potrzebne do wyznaczenia czasu podwojenia liczby komórek były dodatkowymi metodami oceny wzrostu badanych linii komórkowych a test TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling) posłużył do oceny stanu apoptozy w skrawkach tkanek. Heterotropowe ksenoprzeszczepy komórek nowotworowych polegające na podskórnym podaniu komórek badanych nowotworów oka, wykonano u myszy bezgranicznych szczepu Balb/c nude, pozbawionych funkcjonalnych komórek T. W tej części pracy na uwagę zasługuje opis zmiany formuły handlowo dostępnej lizosomalnej formy werteporfiny aby otrzymać wyższe stężenie VP do absorpcji z otrzewnej i docelowo większe nagromadzenie VP w guzie, biorąc pod uwagę, że związek ten powinien być stabilny przez ok. 1 miesiąc trwania wzrostu guzów u myszy. Wydaje się, że opis ilościowej analizy metforminy metodą chromatografii cieczowej i spektrometrii mas (str. 38) nie był konieczny, gdyż został wykonany na zlecenie w innym laboratorium. Z kolei w opisie testów immunohistochemicznych brakuje wzmianki o przygotowaniu skrawków guzów i tkanek myszy (także str. 38 oraz 39).

„**Wyniki**” badań, stanowią największy rozdział pracy, zostały przedstawione na 85 stronach w postaci 45 w większości złożonych rycin oraz dwóch tabeli. Autorka kolejno omawia poszczególne etapy doświadczeń

poprzedzając je właściwym wprowadzeniem a także krótko je w każdym podrozdziale podsumowując. Należy tu podkreślić, że w wielu testach stosowano wielokrotne powtórzenia osobnych doświadczeń a także odpowiednio dobrane kontrole, jak np. dodatkową kontrolę powstawania specyficznych produktów w qRT-PCR czy użycie komórek nienowotworowych do porównania z badanymi nowotworowymi.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy doktorskiej przedstawionej w pierwszej części rozdziału „Wyniki” należy pokazanie, że **AICAR** hamuje żywotność komórek czerniaka naczyńiówki w warunkach *in vitro* oraz obniża znacząco zawartość transkryptów dla cyklin A i D w trzech badanych liniach tego czerniaka. Autorka wykazała, że lek AICAR prawie o połowę hamuje wzrost guza siatkówczaka (retinoblastoma) u myszy bezgrasiczych Balb/c nude a na poziomie molekularnym aktywuje w komórkach guza AMPK (kinazę aktywowaną AMP, główny inhibitor aktywacji mTOR), co prowadzi do zahamowania szlaku mTOR (pokazano specyficzne fosforylacje białek S6RP i eIF4E-BP1) i aktywności enzymatycznej karboksylazy acetylokoenzymu A (ACC). Ponadto, przeciwnowotworowe działanie AICAR było także związane z obniżeniem proliferacji komórek siatkówczaka w guzie (spektakularne, do ok. 20% kontroli zahamowanie poziomu białka Ki-67) oraz indukcją apoptozy. Lek AICAR wyraźnie hamował powstawanie nowych naczyń guza (obniżenie CD31, markera kapilar) oraz naciekanie makrofagów i neutrofilii (komórki CD11b<sup>(+)</sup>) w porównaniu do guzów myszy kontrolnych, nieotrzymujących leku. W uzupełnieniu tych badań Autorka przedstawiła wyniki ilościowego oznaczenia transkryptów sześciu cyklin, których poziom nie zmieniał się pod wpływem AICAR oraz inhibitora kinaz cyklinozależnych, białka p21, którego zawartość była zahamowania o 1/3 wartości kontrolnej.

Do tej części wyników mam uwagi krytyczne. Po pierwsze, nie przedstawiono hamującego wpływu AICAR na wzrost siatkówczaka w warunkach *in vitro*, chociaż podtytuł 3.1.1. (str. 42) to sugeruje. Po drugie, niepowodzenie w uzyskaniu ksenoprzeszczepów dwóch linii komórek czerniaka naczyńiówki (MEL92.1 i MEL202) u stosowanych myszy bezgrasiczych (opisane na str. 46), ma swój komentarz w publikacji przeglądowej Stei MM i in. (BioMed Res Int, 2016). Co więcej, niepublikowane dane zespołu p. dr hab. Martyny Elas z WBBiB i grupy francuskich badaczy wskazują na konieczność podania komórek czerniaka naczyńiówki nie podskórnym (bo wówczas komórki nie rosną dobrze) a do poduszki tłuszczowej międzyłopatkowej myszy, u której ten tłuszcz jest bardzo dobrze ukrwiony co zapewne przyczynia się lepszemu wzrostu podanych w ten sposób komórek czerniaka (ponad 30% sukcesu). Wreszcie, badania nad regulacją cyklu komórkowego wydają się wyrywkowe i niepełne. W badaniach metodą western blot przewijają się aż 4 różne kontrole równego

obladowania ścieżek żelu do rozdziału białek: GAPDH, tubulina, aktyna lub tylko barwienie błękitem Coomassie.

Druga część wyników pracy przedstawia wpływ **metforminy** (podobnie jak leku AICAR) na dwa nowotwory oka – siatkówczaka i czerniaka naczyniówki. Zgromadzono wyniki uzyskane głównie dla siatkówczaka w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Można przypuszczać, że jak skomentowano powyżej, komórki czerniaka nie rosły u myszy z powodu niewłaściwej drogi podania. Metformina hamuje żywotność i wzrost (czas podwojenia liczby komórek mierzony w teście z błękitem trypanu) 2 linii siatkówczaka i 3 linii czerniaka naczyniówki po dłuższych czasach inkubacji (odpowiednio 3 i 5 dni) zastosowana w milimolowych ale nie mikromolowych stężeniach. Metodą cystometrii przepływowej (FACS) i w teście tworzenia kolonii w miękkim agarze Autorka pokazała, że metformina obniża żywotność komórek siatkówczaka i liczbę oraz rozmiar powstających kolonii tych komórek. Lek ten blokuje postęp cyklu komórkowego w fazie G1 i S, przy czym obie testowane linie siatkówczaka wykazują pewne różnice w postaci wydłużenia lub skrócenia tych dwóch faz. W tych samych dwóch liniach komórkowych metformina hamowała poziom inhibitorów cyklu komórkowego, p21 i p27 oraz fosforylowaną formę p44/42 MAPK a aktywująca fosforylacja Akt na Ser 475 była przez ten lek zahamowana tylko w linii WERI, co popierało wnioski Autorki o hamującym wpływie metforminy na wzrost i proliferację badanych komórek. Dalsze badania pokazały także hamowanie szlaku mTOR (fosforylacje S6RP i 4E-BP1) oraz indukcję autofagii ale ten ostatni proces jedynie na poziomie białka LC3B, świadczącego o przebiegu początkowego etapu. Oznaczony wzrost fosforylowanej formy białka p38 MAPK, które mogłoby hamować komórki nowotworowe przez szlak ERK i zatrzymanie cyklu komórkowego oraz indukcję senescencji a także aktywacja AMPK (zmierzona wzrostem fosforylacji karboksylazy acetylo-koenzymu A) popierają wniosek Autorki o hamowaniu przez metforminę szlaków pro-przeżyciowych w komórkach siatkówczaka. Jako uzupełnienie tej grupy badań, oznaczono wpływ metforminy na wzrost ksenoprzeszczepów linii siatkówczaka Y79 u myszy Balb/c nude, co pokazało brak wpływu tego leku na objętość i wagę guzów pomimo utrzymujących się we krwi i guzie oczekiwanych poziomów tego leku. W tej sytuacji, dalsze analizy guzów tego siatkówczaka wydawały się być bezcelowe, pomimo to przeprowadzono je. Oznaczenia te pokazały, że „farmakologiczne” poziomy metforminy pozostają bez wpływu na poziomy AMPK, mTOR i p21 a także proliferację i apoptozę oraz powstawanie naczyń i naciekanie komórek mieloidalnych (CD11b pozytywnych) w badanych guzach.

Do tej części wyników uwagi krytyczne (poza wymienioną powyżej) są następujące: 1) Co znaczy określenie „normal liver cells” ?, str. 57 – czy są to

hepatocyty ? 2) Oznaczenia literowe do figury 9 (str. 57) są pomyłone. 3) W Fig. 8 i 9 (podobnie w Fig. 1) pokazano hamowanie żywotności komórek siatkówczaka a nie proliferacji, o proliferacji możnaby mówić, kiedy oznaczane jest np. białko Ki-67 czy mierzone jest wbudowywanie BrdU. 4) Tabela 4 (str. 60) to już Tabela 5. 5) Sugestia, że p21 posiada wyjątkową rolę w siatkówczaku, być może jako onkogen, nie do końca jest jasna. Wydaje się, że wyniki dotyczące p21 przedstawione w rozprawie są zbyt wrywkowe i nie upoważniają do wyciągnięcia powyższego wniosku. Trzeba wziąć pod uwagę, że bezwzględna zawartość białka p21 jeszcze nie świadczy o jego aktywności. Tylko ta część puli p21, która jest związana z CDK4 (i jest uwalniana z tego kompleksu przez surwiwinę) może hamować postęp cyklu komórkowego. 6) W Fig. 21 brak statystycznego opracowania wyników czterech niezależnych doświadczeń – pokazano jedynie pojedyncze western bloty.

Trzecia, ostatnia grupa wyników podsumowuje wpływ **werteporfiny** na wszystkie 3 badane nowotwory oka – siatkówczaka, czerniaka naczyniówki i glejaka nerwu wzrokowego. Badany związek hamował wzrost wszystkich 3 nowotworów oka *in vitro*, podczas gdy jego wpływ na wzrost ludzkich komórek nienowotworowych oka (komórki nabłonka i śródbłonna siatkówki - ARPE19 i RVEC) był nieznaczny (test MTT, z błękitem trypanu i wyznaczenie czasu podwojenia liczby komórek). Dalsze badania *in vitro* z udziałem werteporfiny przeprowadzone zostały albo jedynie na komórkach siatkówczaka albo na komórkach siatkówczaka i glejaka, natomiast wszystkie badania *in vivo* dotyczyły tylko linii komórek siatkówczaka. Pokazano, że VP wydłuża (dla Y79) lub skraca (dla WERI) czas trwania faz G0/G1 i odpowiednio przeciwnie wpływa na fazę S zależnie od linii siatkówczaka. Takie działanie VP związane było z zależnym od czasu i dawki spadkiem zawartości cyklin D1, D3, E1, E2 i A2 w liniach Y79 i WERI, które jednak wykazywały pewne różnice pod względem zawartości cyklin D1 i D3 oraz E2. Następnie, Autorka pokazała, że w komórkach 2 linii siatkówczaka VP hamuje zawartość dwóch inhibitorów kinaz cyklino-zależnych, p21 i p27, indukuje aktywującą fosforylację kinazy p38, nie zmienia zawartości PCNA (antygeny jądrowego proliferującej komórki) i hamuje (w Y79) lub indukuje aktywujące fosforylacje kinazy Akt na S473 i T308. Z kolei w 2 liniach glejaka, fosforylacja p38 jest także znacząco statystycznie indukowana przez VP, podczas gdy fosforylacja Akt na S473 nie zmienia się. Dodatkowo w 2 typach nowotworów – siatkówczaku i glejaku, pokazano, że VP silnie hamuje pro-onkogenny szlak angażujący białka YAP-TEAD, mający wpływ na protoonkogen c-myc, inhibitor apoptozy - surwiwinę czy białko receptorowe Axl oraz związanych z tym szlakiem białek uczestniczących w migracji i angiogenezie badanych guzów, Cyr61, CTGF i VEGFA. Sprawdzenie poziomu fosforylacji białek S6RP i 4EBP w obu typach nowotworów

dostarczyło pośredniego dowodu na hamowanie przez VP szlaku mTOR (aktywowanego przez białko YAP, dzięki hamowaniu przez YAP białka PTEN – inhibitora szlaku mTOR) w siatkówczaku i brak tego efektu w glejaku. Powyższe dane tylko potwierdziły przypuszczenie, że skutki działania badanego leku są zależne od linii komórkowej. VP hamowała także w obu typach nowotworów zawartość czynnika transkrypcyjnego Oct4 (jednocześnie czynnika utrzymującego pluripotencję komórek prekursorowych nowotworu i onkogenu o charakterze antyapoptotycznym). W warunkach *in vivo*, z użyciem linii siatkówczaka Y79 pokazano brak wpływu VP na wzrost ksenoprzeszczepów u myszy bezgrasiczych a także brak (w przeciwieństwie do wyniku *in vitro*) hamowania w powstałych guzach 2 białek szlaku YAP-TEAD – CYR61 i surwiwiny. VP hamuje w tych guzach fosforylację białka szlaku mTOR - 4EBP oraz marker pluripotencji – Oct4 ale nie ma wpływu na zawartość p21. VP także nie zmieniała proliferacji i stanu apoptozy komórek guza, natomiast hamowała wzrost nowych naczyń w guzie. Na koniec tych badań, Autorka wykazała w badaniach *in vitro* obu linii siatkówczaka, że połączone traktowanie tych komórek jednym z 3 chemioterapeutyków, melfalanem, winkrystyną i topotekanem, oraz VP potęguje hamujący efekt wykazywany przez VP stosowaną pojedynczo. Do tego ostatniego wyniku (str. 121) brakuje wykazania poprzez odpowiednie przeliczenia, że efekt obu stosowanych czynników: Vp i danego chemioterapeutyku rzeczywiście jest synergistyczny.

Krytyczne uwagi do tej części: 1) Tabela 5 na str. 92 powinna mieć nr 6. 2) Opisany na str. 92 wynik zatrzymania cyklu komórek WERI w fazie G0/G1, to w rzeczywistości skrócenie tych faz. 3) Części Fig. 27 mają pomyłone literowe oznaczenia – części D do F, to C do E a G do N, to F do J. 4) Zamiast „Akt levels in glioblastoma ...” (str. 97), powinno być: „Akt **phosphorylation** levels ...”. 5) Błąd w tytule podrozdziału 3.3.9. (str.115) – ma być „downregulatory effect **on** mTOR”. 6) Na Fig. 38 i 39 chyba pomyłkowo zamieniono opisy słupków „8h” i „24h”. 7) Na Fig. 42-45 pokazano żywotność komórek a nie proliferację.

Licząca 11 stron **Dyskusja** pracy jest napisana w sposób dojrzały, świadczący o dogłębnej znajomości tematu badań oraz została poparta wieloma danymi z piśmiennictwa. Autorka podkreśla, że dotychczas nie opublikowano badań nt wpływu VP bez aktywacji światłem na nowotwory oka. Podobnie jest ze związkiem AICAR, który w badaniach p. Brodowskiej okazał się po raz pierwszy czynnikiem hamującym wzrost nowotworów oka. W tej części pracy dyskusja nt efektów AICAR została podsumowana w postaci schematu (Fig. 46). Jest też zamieszczony ważny komentarz na temat różnic w odpowiedzi komórek nowotworowych na dany lek (tu: VP) w warunkach hodowli *in vitro* i u myszy *in vivo*. Także dla metforminy pokazano, że jej efekt anty-nowotworowy zależy od typu nowotworu.

Autorka przewiduje, że długotrwałe stosowanie metforminy w leczeniu cukrzycy mogłoby hamować wzrost nowotworów oka lub nawet zapobiegać ich powstawaniu. Część dyskusji poświęcona została rozważaniom nt efektów badanych leków na poziomie molekularnym, na takie szlaki jak mTOR czy Hippo. Ciekawie opisano hamujący wpływ badanych leków i czynników regulatorowych na angiogenezę w nowotworach oka. Nie można jednak zgodzić się z opinią wyrażoną przez Autorkę na str. 134, iż „these tumors were disappearing spontaneously” (w domyśle guzy czerniaka i glejaka), gdyż w przypadku czerniaka naczyniówki najprawdopodobniej komórki od chwili podania słabo rosły i nie tworzyły guza. Na zakończenie dyskusji Autorka wyraża przekonanie, że podanie do ciała szklistego oka niższych dawek chemioterapeutyków w kombinacji z VP będzie bezpieczne i bardziej skuteczne niż terapie z użyciem pojedynczych leków. Tu po raz pierwszy Autorka pisze, że efekt obu typów leków może być synergistyczny lub addytywny.

Praca jest napisana poprawnym językiem, ale spis **piśmiennictwa** zawiera sporo niedociągnięć, takich jak pominięcie nazwy czasopisma (w 37 z 224 pozycji), brak tytułu książki (w dwóch) czy tytułu pracy (także w dwóch) oraz roku wydania (w poz. 17, str. 143) a także w dość dowolny sposób stosowano skróty nazw czasopism i sposób pisania słów w tytułach prac – raz z dużej a raz z małej litery. Nie wiadomo także, z jakich względów Autorka pominęła w spisie piśmiennictwa wszystkie swoje publikacje z tematyki ściśle związanej z przedmiotem rozprawy doktorskiej, zwłaszcza, że są one cytowane przez innych badaczy.

Wszystkie przedstawione powyżej drobne niedociągnięcia nie mają wpływu na ogólną **wysoką ocenę** rozprawy doktorskiej.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani **Katarzyny Brodowskiej**, lekarza medycyny, spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz.595 z późn. zm.). Jednocześnie proszę o dopuszczenie p. Katarzyny Brodowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Hanna Rokita