Prof. dr hab. med. Grzegorz DWORACKI
Katedra Patomorfologii i Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Rokietnicka 5D
60-508 Poznań
tel. +48 61 854 7175
e-mail: gdwrck@ump.edu.pl

Ocena pracy doktorskiej
Mgr Katarzyny KACZMAREK
pt. "Opracowanie modelu immunoterapii raka jelita grubego u myszy z wykorzystaniem modelu zmodyfikowanych genetycznie bakterii *Lactococcuc lactis*".

Rak jelita grubego stanowi jeden z najczęstszych nowotworów u człowieka, stanowi duży problem społeczny, a także osobisty dotkniętych nią osób, często będących w wieku pełnej aktywności zawodowej i radości życia osobistego. Obecne podstawowe strategie terapii raka jelita grubego obejmują leczenie chirurgiczne i chemioterapeutyczne. Są to terapie nieselektywne obciążone licznymi objawami ubocznymi i powikłaniami, nie są przy tym zadowalająco efektywne. Istnieje ciągła potrzeba doskonalenia metod terapii, szczególnie poszukiwanie mniej toksycznych, spersonalizowanych form skutecznych terapii. Takie terapie, ostatnio w licznych nowotworach, także w raku jelita grubego się pojawiają. Często oparte są na mechanizmach immunologicznych np. przy zastosowaniu blokerów immunologicznych punktów kontroli.

Magister Katarzyna KACZMAREK zaproponowała ciekawy poznawczo i nowatorski pomysł modelu terapii z użyciem jako nośnika leku bakterii, a ich modyfikacja genetyczna posłużyła jak element terapii wykorzystujący naturalne mechanizmy regulacji proliferacji komórek.

Cel pracy sformułowany jest jasno, a dotyczył sprawdzenia czy niepatogenne bakterie *Latococcu lactis NZ9000,* zmodyfikowane genetycznie do wydajnej sekrecji ludzkiego rozpuszczalnego białka TRAIL (hsTRAIL – human soluble TRAIL), mogą stanowić efektywny i bezpieczny nośnik eliminacji ludzkich komórek raka jelita grubego.
Sformułowany wyżej główny cel pracy opisany jest czterema cząstkowymi, mającymi doprowadzić do jego realizacji, a dotyczącymi:

1. zmodyfikowanego szczepu bakterii,
2. protokołu ekspresji rozpuszczalnego białka hs TRAIL,
3. wpływu nośnika bakteryjnym białka hsTRAIL na wzrost guza w dwóch mysich modelach transplantacyjnych,

4. przeżywalności zmodyfikowanych genetycznie bakterii Lactococcus lactis w mikrośrodowisku raka jelita grubego *in vivo*.

Kandydatka założyła bardzo szeroki zakres badań, które opinii recenzenta są jednak konieczne i dobrze zaplanowane, dają podstawy prawidłowej weryfikacji postawionych hipotez badawczych i osiągnięciu podstawowego celu pracy.

W części teoretycznej rozprawy, we wstępie, autorka bardzo przejrzyście przedstawiła zagadnienia związane z dostępnymi danymi dotyczącymi realizowanej pracy. Uwzględniła przy tym wyczerpująco znane czynniki ryzyka występowania raka jelita grubego, podstawowe elementy dotyczące oceny klinicznej, a także bliżej omówiła elementy charakterystyki molekularnej podstawowych typów raka jelita grubego. Kandydatka omówiła także wyczerpująco obecnie stosowane strategie leczenia z uwzględnieniem nowszych strategii obejmujących blokery immunologicznych punktów kontroli, a także podejmowane spersonalizowane, strategie molekularne np. wykorzystujące inhibitory naczyniowego czynnika wzrostu (VEGF), białka fuzyjne, inhibitory kinaz czy przeciwciała monoklonalne stosowane przeciw nabłonkowemu czynnikowi wzrostu (anty-EGFR). Następnie wyczerpująco i dokładne opisuje wykorzystywane w badaniach doświadczalnych mysie modele nowotworów przeszczepialnych i indukowanych, skupiając się na ich zaletach i wadach, logicznie uzasadniając wybór modeli do prowadzonych w ramach rozprawy prac doświadczalnych. We wstępie Kandydatka zawarła istotne dane charakterystyki molekularnej i biochemicznej białka TRAIL i jego ligandów, z wyczerpującym opisem efektów ich interakcji w odniesieniu do regulacji proliferacji i szlaków indukcji apoptozy i zaburzeń ścieżek sygnałowych, które pojawiają się w procesie karcinogenezy, a wiążą się z opornością komórek raka jelita grubego na sygnały śmierci białka TRAIL. Autorka przytacza także dane z pojawiających się badań klinicznych terapii nowotworów w których wykorzystywano interakcje białka TRAIL. Osobna obszerna część wstępu dotyczy charakterystyki wykorzystanych w części doświadczalnej pracy bakterii kwasu mlekowego Lactococcus lactis z uwzględnieniem wszystkich istotnych z punktu widzenia pracy elementów i etapów ich modyfikacji genetycznej, łącznie z charakterystyką genetyczną oraz szczegółami technicznymi dotyczycącymi warunków prowadzenia hodowli. Ostatnią częścią wstępu jest wyczerpująca charakterystyka wykorzystanego w pracy nizynowego systemu ekspresji genów NICE.

Duża liczba przytaczanych we wstępie szczegółów, także tych metodycznych nie przytłacza, jest logicznie i przejrzyście zorganizowana i powiązana. Opis ten świadczy o dużej dociekliwości, docierania do istotnych szczegółów, ciekawości tematu i talentu badacza, biegle poruszającego się w licznych szczegółowych i często nowych obszarach wiedzy. Ta część

pracy stanowi bardzo dobre wprowadzenie i podstawę dla właściwej interpretacji przedstawionych w kolejnych częściach dysertacji wyników badań. Wstęp pracy w opinii recenzenta we właściwych proporcjach podejmuje istotne do podjętego tematu pracy zagadnienia i w wyczerpujący sposób, ale nie nadmierny, wyjaśnia to co dla podjętego tematu jest ważne. Ponadto opis opatrzony jest czytelnymi rycinami z podaniem źródeł i co ważne z zaznaczeniem ewentualnego faktu ich modyfikacji. Zakres i wnikliwość, co do szczegółów przedstawianych zagadnień dowodzi także bardzo dobrego teoretycznego przygotowania doktorantki do podjętego tematu.

W części metodycznej pracy Kandydatka szczegółowo opisuje wszystkie etapy prowadzonych badań *in vitro i in vivo*. Badania zostały w opinii recenzenta prawidłowo zaplanowane i przeprowadzone, zastosowano właściwą dla realizacji założonych celów metodykę pracy. Poszczególne etapy są poza opisem, kiedy to konieczne uzupełnione czytelnymi tabelami, schematami, rycinami i zdjęciami. Kandydatka prawidłowo zaprojektowała część doświadczalną, właściwie dobierając grupy badawcze, właściwie zbierając i zabezpieczając do badań materiał biologiczny, a także weryfikując jego jakość. Opis przeprowadzenia doświadczeń jest szczegółowy i nie budzi zastrzeżeń co do prawidłowości i wartości wykonanych oznaczeń, jest jednoznaczny, tak że daje możliwość dokładnego powtórzenia doświadczeń przez inny zespół. Nie ma takiej konieczności, ale dowodzi jasności przekazywanych treści. Z dysertacji wynika, że większość prac doświadczalnych Kandydatka wykonała samodzielnie i to w szerokim zakresie wykorzystywanych technik badawczych, co dowodzi dużej wszechstronności warsztatowej Kandydatki. Tam, gdzie nie było to możliwe badania były prowadzone we współpracy z innymi placówkami badawczymi, co miało miejsce np. przy sekwencjonowaniu izoform białka hsTRAIL. Kandydatka szczegółowością opisu takich doświadczeń dowodzi jednak nie tylko, że zna stosowane techniki, ale i aktywnie uczestniczyła w prowadzeniu tych doświadczeń, znając ich nie tylko silne strony, ale i ograniczenia.

Wyniki przedstawione są bardzo szczegółowo, rzetelnie i przejrzyście, co przy dużej ich liczbie (przedstawione na 51 stronach) stanowiło duże wyzwanie, z którym kandydatka poradziła sobie bardzo dobrze. Cenne jest podzielenie wyników w kolejne logicznie wynikające z siebie etapy (rycina 6, strona 73) opisane systematycznym opisem konkretnych analiz. Całość wyników jest logicznie usystematyzowana w szeregu tabel, rycin i ilustrujących zdjęć opatrzonych szczegółowym opisem, wyjaśniającymi komentarzami i legendami. Warto jednak w tym miejscu, bardziej tytułem uzupełnienia niż krytyki zwrócić uwagę na kilka drobiazgów metodycznych. Cennym jest że ocena apoptozy na komórkach linii HCT116 po indukcji hs TRAIL, poza metodami pośrednimi takimi zastosowane przy użyciu cytometrycznej wiązania

Aneysyny V była także, stosownie do morfologicznego terminu jakim jest apoptoza (grec. opadanie liści) weryfikowana przy użyciu mikroskopu, rycina 11C. Szkoda jednak, że użyte powiększenia mikroskopowe są bardzo małe i tak na prawdę trudno na podstawie przedstawionych fotografii stwierdzić czy faktycznie mamy do czynienia z apoptozą. Powiększenia powinny być zdecydowanie większe, tak by można było zweryfikować szczegóły zmian morfologicznych komórki. Przedstawione zdjęcia niestety zdecydowanie na to nie pozwalają. Poza tym poza przedstawioną oceną w mikroskopie fazowo-kontrastowym można by także uzupełnić zdjęciami spod mikroskopu fluorescencyjnego, wykorzystując komórki które były oceniane w cytometrii przepływowej. Poza szczegółami morfologicznymi można by zweryfikować zmiany morfologii jądra komórkowego i obecności ciałek apoptotycznych w barwieniu na pomarańczowy kolor jodku propidyny i w zielonym kolorze aneksyny wiązanej do fosfatydyloseryny. Przedstawione na rycinie 11 D (strona 84) ryciny „dot-plot" wiązania aneksyny można by także uzupełnić o przedstawienie na osiach rozproszeń FSC/SCC jak komórki do analizy były bramkowane. W procesie apoptozy obraz morfologiczny komórek widoczny i w mikroskopie i w cytometrii przepływowej bardzo się zmienia. Najpierw komórki stają się większe, pęcznieją, następnie się kurczą, co powoduje, że ich obraz morfologiczny w rozproszeniach światła lasera w cytometrii bardzo się zmienia, co w zasadniczy sposób w zależności od bramkowania wpływa na wyniki.

Cennym jest autorskie opracowanie przez Kandydatkę modelu hodowli bakterii L.Lactis(hsTRAIL+) w ko-inkubacji z komórkami nowotworowymi. Ocena morfologiczna wymagałaby tu jednak bardziej szczegółowego opisu zmian morfologicznych sfer komórek linii HCT116. Poza stwierdzeniem „sfera o zaburzonej morfologii" brak jednak opisu czego zaburzenia morfologii dotyczą i czy zmiany te mają cechy czułości i swoistości. Podobnie jak w ocenie morfologicznej apoptozy pokazane w wynikach zdjęcia mikroskopowe są wykonane przy zbyt małym powiększeniu jak dla przedstawienia istotnych detali morfologicznych (ryciny 13D i 13D na stronie 88). W opisie i na samych zdjęciach spod mikroskopu bark tu jest podania pomocnych w tym przypadku użytych powiększeń obiektywu.

Bardzo cennym w pracy jest autorski opracowany model hodowli linii komórek nowotworowych w obecności bakterii Lactococcus lactis, który z zastosowanymi systemami kontroli mógłby stanowić osobny przedmiot rozprawy doktorskiej. Model ten w przekonaniu recenzenta może być wykorzystany w szeregu innych opartych na tym modelu pracach doświadczalnych. Podobnie warta dostrzeżenia jest konsekwentne zastosowanie wszystkich poprzednich etapów prac doświadczalnych do wykorzystaniu w kulminacyjnym ortotopowym modelu terapii raka jelita grubego, który tak naprawdę weryfikuje obserwacje in vitro i pokazuje jak cennym może być zaproponowany model, stanowiąc podstawę do rozwoju nowej

drogi podania leków przeciwnowotworowych w spersonalizowanej terapii nowotworów. Bardzo ważnym i dającym możliwości dokładnego śledzenia zastosowanych metod w ocenie wzrostu guza jest wykorzystanie przyżyciowego wzrostu guza metodami bioluminescencji.

Omówienie i dyskusja wyników są bardzo dobrze opracowane, komplementarnie do wstępu i założeń pracy, z dobrym wykorzystaniem i odniesieniem do uzyskanych w części doświadczalnej wyników oraz właściwym osadzeniem w szerokim i trafnie dobranym piśmiennictwie przedmiotu. Doktorantka w tej części pracy wykazała się dojrzałością i dobrą umiejętnością posługiwania się piśmiennictwem naukowym w celu interpretacji uzyskanych wyników.

Wnioski w liczbie dziewięciu zostały sformułowane prawidłowo i są efektem realizacji założonych celów badawczych. Co ważne wnioski nie są prostym powtórzeniem wyników, ale podsumowaniem tego co z nich wypływa. Wszystkie mają istotne znaczenie. Jednym z cenniejszych wniosków, który pojawia się jako suma całości obserwacji poczynionych w pracy jest pokazanie jak silnie mikrośrodowisko wpływa na przebieg nowotworu i to dotycząc istotnych różnic w modelu podskórnym i ortotopowym, gdzie Kandydatka wykazała że wpływ mikrośrodowiska może być zarówno promujący jaki i hamujący rozwój nowotworu. Ważne, że podjęta została także próba wykazania źródła tych różnic, wskazując, że prawdopodobną przyczyną jest obecność makrofagów o profilu M2.

Pewien niedosyt u recenzenta budzi, podobnie jak we innych częściach pracy, pokazanie mikrośrodowiska jedynie na bardzo małych powiększeniach, co jest ogólną uwagą do przedstawianych wyników pracy, gdzie tak naprawdę trudno ocenić jakość reakcji immunohistochemicznych wydzielania białka hsTRAIL i obecności makrofagów; można jednak zauważyć, że istotnym elementem komórkowym nacieków są również limfocyty. Posiadany zatem materiał badawczy stanowi także gotowe źródło do dalszych poszukiwań badawczych. Proszę w tych uwagach wziąć jednak poprawkę, że recenzent jest morfologiem.

Styl i język pracy jest komunikatywny i jasny, plastycznie i obrazowo przedstawia niewątpliwie trudne i czasami nużące ze swej natury zagadnienia, łatwo prowadząc czytelnika przez skomplikowane zagadnienia kliniczne i eksperymentalne. Z obowiązku recenzenta należy zauważyć, że Kandydatka często w odniesieniu do piśmiennictwa używa wyrażenia „literatura" przyjętego co prawda, ale niepoprawnego w tym miejscu; literatura i piśmiennictwo to nie to samo; czasami na jednej stronie (strona 134) używa obu pojęć. Podobnie poprawniejszą formą jest forma „w porównani z" a nie dość częste użycie przez Kandydatkę zwrotu w „porównaniu do" co jest częstym zapożyczeniem z bezpośredniego tłumaczenia tekstów anglojęzycznych. W opisie legendy „Skala: 500 um", powinna być użyta grecka litera „mi" zamiast łacińskiej litery „u" (strona 96).

Autorka właściwie przytacza przypisy do przedstawianych faktów. Dbałości o szczegóły dowodzi umieszczenie w pracy erraty, co nie jest częste w tego typu opracowaniach.

W podsumowaniu chciałbym podkreślić, że mgr Katarzyna KACZMAREK przedstawiła rozprawę doktorską na bardzo dobrym poziomie merytorycznym, zawierającą cenne oryginalne, wyniki o dużej wartości poznawczej, mogące mieć istotne znaczenie praktyczne. Wartą podkreślenia wartością pracy jest sformułowanie przez kandydatkę kolejnych celów badawczych, co jest dowodem jej pasji badawczej, budzi nadzieję na jej dalszy naukowy rozwój i dowodzi także wartości wsparcia promotora, w samodzielnym rozwoju naukowym Kandydatki. Przedstawione przeze mnie uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości pracy i uzyskanych wyników, mam jedynie nadzieję, że będą pomocne w przygotowani wyników do kolejnej oryginalnej publikacji.

Na podstawie dokonanej oceny stwierdzam, iż rozprawa doktorska zatytułowana "Opracowanie modelu immunoterapii raka jelita grubego u myszy z wykorzystaniem modelu zmodyfikowanych genetycznie bakterii *Lactococcuc lactis*" nie tylko w pełni odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych, ale znacznie je przekracza i w związku z tym mam zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauki medyczne Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o dopuszczenie rozprawy mgr Katarzyny KACZMAREK wykonanej w Zakładzie Immunologii Klinicznej, Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wartość uzyskanych wyników i możliwości ich publikacji, a także włożony wysiłek i bardzo szeroki zakres badań wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Poznań, dnia 4 kwietnia 2021 r