Prof. dr hab. n. med. Rafał Tarnawski Katowice 20.02.2021

NIO-PIB Oddział w Gliwicach

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kaczmarek pt. Opracowanie modelu immunoterapii raka jelita grubego u myszy z wykorzystaniem zmodyfikowanych genetycznie bakterii Lactococcus lactis.

Przedstawioną mi do recenzji pracę oceniam bardzo pozytywnie, praca spełnia wszystkie ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Jednocześnie praca ta prezentuje wyjątkowo wysoki poziom naukowy, wyniki pracy zostały częściowo opublikowane w recenzowanym periodyku naukowym, przedstawiam Radzie Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o wyróżnienie pracy.

UZASADNIENIE

Przedstawiona mi do recenzji praca ma charakter oryginalnej monografii. Monografia ma 163 strony wraz ze streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwem obejmującym 336 pozycji literaturowych. W pracy umieszczono 5 tabel i 33 ryciny. Praca ma strukturę typową dla monografii i składa się ze wstępu, założeń i celu pracy, opisu materiału i użytych metod, opisu wyników, dyskusji, praca podsumowana jest we wnioskach.

Monografia przygotowana jest niezwykle starannie, napisana poprawną polszczyzną. Docenić należy zachowanie logicznego wywodu, co znacznie ułatwia lekturę pracy. Praca należy do najstaranniej przygotowanych monografii.

Tematem pracy jest opracowanie modelu immunoterapii raka jelita grubego u myszy z wykorzystaniem zmodyfikowanych genetycznie bakterii Lactococcus lactis.

Temat jest bardzo istotny zarówno z punktu widzenia poznawczego jak i praktycznego. Należy docenić odwagę i ambitnie zarysowany plan badań autorki. Praca jest bardzo obszerna i nie zdziwiłbym się gdyby była podstawa do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.

Rak jelita grubego pozostaje istotnym problemem klinicznym i społecznym zarówno z powodu dużej częstości występowanie jak i stosunkowo dużej oporności na stosowane leczenie systemowe. W ostatnich latach coraz większe znaczenie w leczeniu zawansowanego raka jelita grubego ma zarówno immunoterapia jak i leki ukierunkowane molekularnie. Leki te przedłużają czas do progresji choroby i

mają pozytywny wpływ na przedłużenie czasu przeżycia chorych na zaawansowanego raka jelita grubego. Często leki te są peptydowe i ulegają szybkiemu rozkładowi w organizmie. Autorka zaproponowała innowacyjną metodę w której peptyd indukujący proces apoptozy produkowany jest przez zmodyfikowane genetycznie bakterie. Produkcja i wydzielanie peptydu jest kontrolowane poprzez obecność specyficznego aktywatora - nizyny, która dodatkowo jest nieszkodliwa dla organizmu ludzkiego. Z założenia peptyd hs-TRAIL ma indukować apoptozę w komórkach raka grubego. Komórki krypt jelitowe pozostają oporne na aktywność cytotoksyczną TRIAL. W ramach szerokiego zakresu badań autorka w pierwszym etapie przygotowała bakterie wprowadzając do szczepu L.Lactis NZ9000 wyposażonego w genetyczny system ekspresyjny NICE wektorem plazmidowym pNZ8124 sekwencję cDNA kodującą syntetyczny TRAIL, a następnie wyselekcjonowała klon L.lactis(hsTRAIL+). W kolejnym etapie prac doktorantka zoptymalizowała warunki hodowli. W kolejnych etapach badań autorka udowodniła, że L.lactis(hsTRAIL+) produkuje hsTRIAL. L.lactis(hsTRAIL+) został wykorzystany do bardzo szerokiego zakresu eksperymentów obejmujących badania in vitro na linii komórkowej w monowarstwie i w hodowli 3D sfer. Badania in vivo wykonano na modelu podskórnym i ortotopowym raka jelita grubego z wykorzystaniem najnowocześniejszych metod laboratoryjnych.

W badaniach in vitro oceniano wpływ produkowanego przez zmodyfikowane bakterie hsTRIAL na żywotność komórek nowotworowych w monowarstwie i sferach, mierzono apoptozę, oceniano ekspresję receptorów TRIAL DR4 i DR5. W badaniach in vitro szczególnie interesujący wydaje mi się eksperyment z ko-hodowlą komórek nowotworowych i bakteryjnych. W badaniach in vivo oceniano wzrost guza, a po eutanazji zwierząt oceniano przeżywalność bakterii, weryfikowano obecność hsTRIAL, utrwalone guzy oceniano histologicznie (barwienie HE) i immunohistochemicznie.

W rozdziale Wstęp autorka opisuje problematykę związaną z występowaniem i leczeniem raka jelita grubego. Dobór przedstawionych informacji jest perfekcyjny. Następnie autorka opisuje mysie modele stosowane w oszukiwaniu nowych strategii terapeutycznych z uwzględnieniem zawansowanych metod implantacji nowotworu do przewodu pokarmowego myszy. Ten trudny i pracochłonny model został w powodzeniem wykorzystany w doktoracie. W kolejnym podrozdziale autorka opisuje znaczenie białka TRAIL w procesie apoptozy z uwzględnieniem licznych szlaków zależnych od różnorodnych receptorów. Dobór prezentowanych w podrozdziale danych jest niezwykle przydatny w zrozumieniu założeń pracy. W trzeciej części wstępu, autorka w przystępny sposób opisuje biotechnologie związane z produkcją przez zmodyfikowane bakterie białka hsTRIAL.

Cel pracy jest bardzo ambitny. Głównym celem pracy było zbadanie czy zmodyfikowane bakterie L.lactis mogą służyć do dostarczania oraz wydajnej lokalnej produkcji białka hsTRIAL, przyczyniając się do skutecznej eliminacji ludzkich komórek jelita grubego w organizmie myszy.

Jest to cel bardzo innowacyjny i mający bardzo duże znaczenie poznawcze, potencjalnie o bardzo dużym znaczeniu praktycznym. Cel ten wymagał bardzo dużego nakładu pracy z wykorzystaniem najnowszych metod laboratoryjnych.

W rozdziale Materiały i Metody doktorantka szczegółowo i niezwykle przejrzyście opisała bardzo liczne eksperymenty przeprowadzone w ramach kompleksowych i bardzo dobrze zaplanowanych badań. Nie mam żadnych uwag krytycznych do tego rozdziału. Pozostaję pod wrażeniem doskonałego i logicznego zaplanowania badań. Zarówno grupy badane jak i kontrolne są właściwe dobrane i wynikają z wcześniej wykonanych eksperymentów. Przykładem jest wybór metforminy jako substancji badanej równolegle z hsTRIAL. W badaniach wstępnych wykazano, że właśnie metformina może mieć działanie synergistyczne z hsTRIAL. We wstępnych eksperymentach badano również takie chemioterapeutyki jak 5-FU i irynotekan.

Przedstawione w tym rozdziale informacje umożliwiają pełną ocenę zastosowanych metod.

Rozdział WYNIKI został podzielony na podrozdziały odzwierciedlające kolejne etapy badań.

Przedstawiono etap inżynierii genetycznej od opracowania syntetycznego konstruktu ludzkiego TRIAL cDNA po opracowanie protokołu indukcji i warunków najbardziej wydajnej ekspresji i sekrecji hsTRIAL, etap badań in vivo na liniach komórkowych 2D i 3D, badania na mysim modelu podskórnym i ortotopowym raka jelita grubego.

Wyselekcjonowany klon L.lactis(hsTRAIL+) produkował duże ilości białka hsTRIAL. Produkcja podlegała indukcji przez nizynę.

Przesącz hodowli bulionowych L.lactis(hsTRAIL+) powodował zależne od stężenia hsTRIAL zmniejszenie żywotności komórek raka jelita, efektu cytotoksycznego nie obserwowano na liniach prawidłowych komórek ludzkiego nabłonka jelit. Kolejne eksperymenty wykazały, że efekt cytotoksyczny hsTRIAL jest spowodowany nasileniem apoptozy w komórkach raka jelita.

Ko-hodowla komórek raka jelita grubego linii HCT116 i SW 480 z bakteriami L.lactis(hsTRAIL+) powodowała istotny spadek żywotności komórek raka jelita grubego.

W przypadku modelu 3D sfer komórek jelita grubego również obserwowano efekt cytotoksyczny hsTRIAL, który jednak nie był proporcjonalny do dawki. Efekt ten można wytłumaczyć utrudnioną penetracją hsTRIAL w głąb sfer w modelu 3D.

W kolejnym etapie badań in vivo dokonano wyboru metforminy jako najbardziej przydatnej substancji jako składnika łączonej terapii wykorzystanej w modelach in vivo.

Badania aktywności przeciwnowotworowej hsTRIAL w modelu podskórnym, oparte były na doguzowym podawaniu bakterii L.lactis(hsTRAIL+). Metformina była podawana sondą dożołądkową.

Zarówno doguzowe podawanie bakterii L.lactis(hsTRAIL+) jak i metforminy powodowało znamienne statystycznie opóźnienie wzrostu guza nowotworowego w porównaniu z grupami kontrolnymi, efekt metforminy i podawania L.lactis(hsTRAIL+) był synergistyczny. Autorka potwierdziła przeżywalność bakterii i wewnątrzguzową produkcję białka hsTRIAL.

W modelu ortotopowym bakterie L.lactis(hsTRAIL+), metforminy i substancje kontrolne były podawane przez zgłębnik. Ocenę wzrostu guza i przerzutów przeprowadzono biolumiscencyjnie dzięki zastosowaniu komórek HTC116 Red-Fluc wykazujących stabilną aktywność lucyferazy. Komórki nowotworowe były implantowane dokątniczo. Codzienne podawanie bakterii L.lactis(hsTRAIL+) sondą żołądkowa przez 37 dni, istotnie stymulowało wzrost guza pierwotnego. Efekt indukcji wzrostu guza nie był zaobserwowany w grupie zwierząt otrzymujących L.lactis(pusty wektor). Podawanie metforminy nie wpływało na stymulację wzrostu nowotworu przez hsTRIAL.

Lokalna produkcja białka hsTRIAL w jelicie grubym myszy powodowała uszkodzenie krypt jelitowych wykazała (ich skrócenie).

Doktorantka stwierdziła zwiększoną infiltrację makrofagów M2 w guzach z grupy myszy otrzymujących L.lactis(hsTRAIL+), co może potencjalnie tłumaczyć przyspieszony wzrost nowotworu.

Cały cykl badań został opracowany i zaplanowany w taki sposób by móc wyjaśnić obserwowane wyniki. Dyskusja jest więc podsumowaniem wyników w relacji do literatury, jednak jej podstawową zaletą jest oparcie głównie na wynikach badań własnych. Literatura służy głównie do poszukiwania mechanizmów i takiego zaplanowania eksperymentu aby jego wyniki mogły być wyjaśnione przez mechanizmy molekularne i przez uznane procesy biologiczne. W mojej opinii jest to podstawowa zaleta recenzowanej pracy.

Prace kończy 9 prawidłowo sformułowanych wniosków, które są podsumowaniem osiągniętych wyników i ich interpretacji w świetle przeprowadzonej analizy i interpretacji danych.

Praca jest napisana wzorowo i nie mam żadnych uwag krytycznych.

Chciałbym zadań doktorantce jedno pytanie.

Jak należy interpretować wyniki analizy histologicznej guzów w modelu podskórnym, w grupie w której podawano doguzowo bakterie L.lactis(hsTRAIL+). W badaniach tych obserwowano nekrozę podczas gdy hsTRIAL powinien raczej powinien indukować apoptozę.

Praca jest bardzo ambitna i z lektury monografii można wywnioskować, że autorka będzie dalej opracowywać materiał co najprawdopodobniej umożliwi liczne publikacje w recenzowanych periodykach naukowych.

Praca spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim. Proszę o dopuszczenie pracy do obrony doktorskiej. Ze względu na jej szczególną wartość naukową przedstawiam wniosek o jej wyróżnienie.

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie -
Państwowy Instytut Badawczy
Oddział w Gliwicach
III Klinika Radioterapii i Chemioterapii
44-102 Gliwice, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15
tel. (32) 278-86-13, fax (32) 278-88-41
REGON 000288366
126/100035/03

KIEROWNIK
III Kliniki Radioterapii i Chemioterapii
prof. dr hab. n. med. Rafał Tarnawski