

Warszawa, 4. 03.2020

Prof. dr hab. Przemysław Juszczynski
Z-ca Dyrektora ds. Nauki
Instytut Hematologii i Transfuzjologii
Ul. Indiry Gandhi 14
Warszawa 02-776

O C E N A

rozprawy doktorskiej lek. wet. Magdaleny Cybulskiej

„Opracowanie mysiego modelu heteroprzeszczepu na przykładzie raka jelita grubego”

W przedstawionej mi do recenzji pracy Doktorantka podejmuje się opracowania i wystandaryzowania metod wyprowadzania mysich heteroprzeszczepów raka jelita grubego (RJG) z tkanek nowotworowych pochodzących bezpośrednio od pacjentów i przeprowadzenia ich charakterystyki histologicznej, transkryptomicznej i genetycznej oraz opracowanie i wystandaryzowanie metod ich bankowania/krioprezerwacji.

Tak zdefiniowany cel pracy w świetle obecnego stanu wiedzy dotyczącej metodyki badań nad nowotworami człowieka jest bardzo aktualny, a utworzenie samego zasobu infrastrukturalnego w postaci PDX (patient-derived xenografts) – nader pożądanego dla prowadzenia wiarygodnych badań w obszarze onkologii. Heteroprzeszczepy lepiej bowiem odzwierciedlają biologię nowotworów człowieka niż dotychczasowe modele. W mysim modelu heteroprzeszczepu nowotwór rozwija się z materiału pochodzącego od człowieka, który wszczepia się zwierzęciu o obniżonej odporności. PDX zachowują heterogenną budowę histologiczną i molekularną guzów ludzkich, przez co stanowią model wierniej i bardziej kompletnie naśladujący pierwotny nowotwór, z którego powstają. Dzięki tym cechom PDX znacząco przewyższają dotychczas stosowane

modele heteroprzeszczepów oparte o linie komórkowe i umożliwiają prowadzenie bardziej szczegółowych badań nad biologią, ewolucją, wrażliwością na leki i mechanizmami oporności na leczenie. PDX są wykorzystywane także w celu indywidualnego projektowania terapii dla chorych.

Wyprowadzenie heteroprzeszczepów nie jest jednak zadaniem prostym. Wymaga ono spełnienia szeregu warunków wynikających z oczywistych potrzeb dotyczących odpowiedniej infrastruktury pozwalającej na hodowlę zwierząt immunoniekompetentnych, dostępności odpowiednio pobranego materiału, a także dużych umiejętności postępowania z tym materiałem i ze zwierzętami. Osobną kwestią jest walidacja i weryfikacja uzyskanych heteroprzeszczepów z wykorzystaniem standardowych metod oceny histologicznej i genetycznej.

Pani lek. wet. Magdalena Cybulska w ramach w swojej pracy doktorskiej wykorzystwała tkanki RJG do wyprowadzenia heteroprzeszczepów u myszy NU/J. Wybrane podejście metodyczne wydaje się najbardziej podstawowym sposobem wyprowadzania PDX (wszczep podskórny). To racjonalny sposób budowania własnego doświadczenia poprzez uczenie się rozwiązywania problemów o niskim stopniu złożoności w pierwszej kolejności, i stawiania kolejnych wyzwań w miarę nabierania doświadczenia i budowania wiedzy. Należy wspomnieć, że doświadczenie lek. wet. M. Cybulskiej nie zawęży się tylko do modelu RJG – nasz zespół współpracuje z Panią Magdaleną Cybulską przy heteroprzeszczepach ostrej białaczki szpikowej.

Rozprawa przedstawiona mi do oceny posiada konstrukcję typową dla prac doktorskich i obejmuje wstęp, przedstawienie celów i zakresu pracy, opis materiałów i metod, wyniki, dyskusję oraz wnioski. Rozprawę uzupełniają streszczenie w języku polskim i angielskim, oraz 92 pozycje piśmiennictwa (w większości bardzo aktualne).

Autorka we wstępie przedstawia historię badań nad tworzeniem nowych leków, zwracając szczególną uwagę na wiedzę o biologii nowotworów jako racjonalną podstawę poszukiwania celów terapii i projektowania nowych struktur chemicznych o potencjalnych właściwościach cytostatycznych/cytotoksycznych. W tej części pracy Autorka nie uniknęła kilku uogólnień, które wydają się nie w pełni uprawnione i/lub stanowią nadmierne uproszczenia. Na przykład – identyfikacja nowych struktur o właściwościach modulatora celu nie zawsze polega na przeszukiwaniu bibliotek

istniejących związków chemicznych. Coraz częściej badania te mają charakter celowanego projektowania związku dokującego do wybranej części białka-celu molekularnego, jak było na przykład w przypadku BH3-mimetyków.

Nadmiernym uproszczeniem wydaje się również teza, iż walidacja celu terapeutycznego wymaga spełnienia trzech warunków, w tym istnienie przesłanki, iż występuje związek przyczynowy między celem terapeutycznym a nowotworem. Otóż ten przyczynowy związek nie zawsze jest spełniony, nawet dla doskonałych celów terapeutycznych. Ten warunek negują następujące przykłady: 1) wspomniane BH3 mimetyki stanowią leki o wysokiej skuteczności w np. AML mimo braku aberracji genetycznych dotyczących BCL2 i braku bezpośredniej roli BCL2 w powstawaniu tego nowotworu; 2) niektóre onkogeny wykazują działanie onkogenne w mechanizmie hit-and-run (na przykład BCL6 w niektórych chłoniakach – zatem sam BCL6 staje się na kolejnych etapach rozwoju nowotworu zbędny i jego inhibicja, mimo oczywistej roli BCL6 w początkowych fazach onkogenezy, nie będzie toksyczna dla komórek); 3) doskonale cele terapeutyczne, takie jak kianza BTK w CLL/MCL nie mają żadnego przyczynowego związku z powstawaniem nowotworu, a mimo to ich wyłączenie ma wysoką skuteczność w terapii.

W kolejnej części wstępu, w której lek. wet M. Cybulska przedstawia zwierzęce modele chorób nowotworowych. Autorka pomija niezwykle ważne modele nowotworów powstające u zwierząt KO/transgenicznych pod względem genów supresorowych lub onkogenów. Modele te przyniosły niezwykle ważne odkrycia dotyczące biologii i patogenezy nowotworów człowieka i zasługują na wzmiankę.

W kolejnym rozdziale lek. wet M. Cybulska przedstawia cele pracy. Głównym celem, jaki Autorka przyjęła, było opracowanie (tj. wdrożenie i wystandaryzowanie) mysiego modelu heteroprzeszczepu RJG, a celem szczegółowym było scharakteryzowanie uzyskanych heteroprzeszczepów w odniesieniu do tkanki pierwotnej i modeli linii komórkowych wzrastających w postaci heteroprzeszczepu.

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorantka przedstawia źródła PDX, sposób preparatyki materiału, szczepy immunoniekompetentnych zwierząt, jakie wybrała na „gospodarzy” PDX, sposób uzyskiwania i utrzymywania heteroprzeszczepów, metody oceny histopatologicznej, transkryptomicznej i genetycznej oraz procedury mrożenia i rozmrażania tkanek.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawia uzyskane wyniki. Uwagę i wątpliwości budzi skąpa dokumentacja wyników, obejmująca jedynie 1 tabelę i 6 rycin. W analizie wyników Autorka skupia się na technicznej stronie wyprowadzania heteroprzeszczepów i ich walidacji względem pierwotnej tkanki. Do tej części pracy mam najwięcej uwag:

1. Autorka wskazuje na kluczową rolę jakości materiału dla powodzenia heteroprzeszczepu – ale nie przedstawia standardu postępowania w tym zakresie. Skoro celem pracy była standaryzacja metod – tego elementu w pracy wyraźnie brakuje. Brak na przykład dokumentacji fotograficznej sposobu opracowania materiału pierwotnego do heteroprzeszczepu i przedstawienia obiektywnych cech, jakie powinna spełniać opracowywana tkanka. Idealnym rozwiązaniem byłoby opracowanie standardowej procedury operacyjnej (być może taka powstała? Jeśli tak – mogła stać się załącznikiem lub częścią pracy)
2. Z jakiego powodu zgodność mutacji typu driver w guzie pierwotnym i PDX mogła wynieść tylko 58%? Brakuje dokładniejszego przedstawienia wyników w tym zakresie. Czy któryś/któreś z wariantów wykazywały większą tendencję do zanikania lub pojawiania się w heteroprzeszczepie?
3. Autorka uznaje, że wyprowadzone heteroprzeszczepy jedynie częściowo odzwierciedlają heterogenność genetyczną pierwotnego guza. Jako potencjalną przyczynę tych rozbieżności Doktorantka uznaje selekcję subklonalną lub pojawienie się nowych mutacji. Ta pierwsza hipoteza wydaje się łatwo testowalna – głębokość sekwencjonowania wyniosła ponad 1700, co powinno pozwolić na wykrycie wariantów o częstości ok. 3%. Czy Autorka przeprowadziła próbę odnalezienia subklonalnych wariantów obecnych w guzach pierwotnych, których reprezentacja rosła w heteroprzeszczepach, lub potwierdzenia odwrotnego scenariusza (zmniejszenie częstości wariantu w heteroprzeszczepie)? W dalszej części pracy, rozbieżności w częstości wariantów w guzie pierwotnym i heteroprzeszczepie Autorka próbuje tłumaczyć naturalną spontaniczną mutagenezą - ta teza wydaje się być nieuprawniona w mojej opinii, zważywszy na tempo ewolucji nowotworów pierwotnych. Tak dużych dewiacji w częstości mutacji można by oczekiwać w przypadku ewolucji nowotworów poddanych presji selekcyjnej np. chemioterapii, ale nie

spontanicznie. Jednakowoż, nawet w przypadku ewolucji wywołanej presją selekcyjną i działaniem związków mutagennych – uważa się, że selekcja istniejących subklonów rzadkich jest bardziej prawdopodobna niż nabycie mutacji de novo.

4. Autorka wskazuje na słabą przydatność klasyfikatorów molekularnych CMS, dokumentując rozbieżności między nimi i rozbieżności w przyporządkowaniu heteroprzeszczepu do odpowiednich klas CMS. Ta część pracy w ocenie recenzenta sprawia wrażenie niedokończonej - Autorka nie próbuje wykorzystać własnych danych do analizy wewnętrznej struktury molekularnej uzyskanych heteroprzeszczepów i guzów pierwotnych, nie próbuje wykazać, że mimo suboptymalnych wyników dostępnych klasyfikatorów – heteroprzeszczepy jednak różnią się między sobą, a być może tworzą klastry do siebie podobne. Autorka dysponuje ortogonalnymi danymi z badań transkryptomicznych, sekwencjonowania szerokiego panelu genów i danych histologicznych – można było się o takie analizy pokusić. Bardzo ich brakuje w mojej ocenie.

W rozdziale „Dyskusja” Autorka krytycznie analizuje własne doświadczenia dotyczące wyprowadzania heteroprzeszczepów, zwracając szczególną uwagę na trudności i ograniczenia metodyczne. Dużą uwagę Autorka zwraca na doświadczenie osoby opracowującej fragment tkanki do heteroprzeszczepu, którego wybór może determinować skuteczność wszczepu. Kolejną część dyskusji Autorka poświęca wykonanym analizom histologicznym, genetycznym i molekularnym, do których uwagi i braki przedstawiłem powyżej. Wnioski odpowiadają celom pracy, a za szczególne osiągnięcie Autorka słusznie uznaje powstanie pierwszego w Polsce biobanku heteroprzeszczepów.

Streszczenia, zarówno w języku polskim, jak i w języku angielskim, właściwie prezentują najważniejsze zagadnienia poruszane w rozprawie.

Pomimo sformułowanych powyżej uwag, uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa stanowi ciekawe, samodzielne, oryginalne i szerokie opracowanie naukowe i niesie bardzo dużą wartość.

Art. 13 ust.1 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki wymaga od Doktoranta, by jego praca stanowiła oryginalne i samodzielne opracowanie naukowe. Mimo faktu, że przedstawiona mi do oceny praca ma bardzo techniczno – metodyczny charakter, należy uznać, że spełnia ona ten wymóg. Jest opracowaniem metody naukowej, która tworzy unikalny w skali kraju zasób infrastruktury badawczej i z pełnym przekonaniem pragnę przedstawić Wysokiej Radzie Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego wniosku o dopuszczenie lek wet. Magdaleny Cybulskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

