



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirsfelda

Polska Akademia Nauk

Centrum Doskonałości: IMMUNE

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (4871) 370 9982, fax: (4871) 370 9975

<http://iitd.pan.wroc.pl>; andrzej.gamian@hirsfeld.pl

Prof. dr hab. Andrzej Gamian

Wrocław, 15.05.2023r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Madeja pt. „Rola uropatogennych szczepów *Escherichia coli* w patomechanizmie raka pęcherza moczowego” wykonanej pod kierunkiem dr hab.

Michała Arabskiego, prof. UJK

Praca dotyczy badań nad molekularnymi podstawami czynników ryzyka rozwoju nowotworu pęcherza moczowego, w szczególności zakażeń bakteryjnych i związanym z nimi przewlekłym stanem zapalnym. Postawione do rozwiązania zadanie jest ważne ze względu na stosunkowo dużą częstość zachorowań na ten nowotwór, rolę czynnika zakaźnego, także potrzebę wyjaśnienia patomechanizmów transformacji w tym typie nowotworu. Zadanie dotyczy więc podstawowych procesów komórkowych, a w praktyce wyniki mogą być pomocne w diagnostyce zakażenia, poznania lekooporności, progresji nowotworu i potencjalnie w terapii. Tematyka ta jest kontynuacją badań prowadzonych przez zespół z Uniwersytetu Jana Kochanowskiego, ekspertów z dużym dorobkiem w tej problematyce i wypracowanym warsztatem badawczym. Podjęty problem jest aktualny, badania mają istotne znaczenie biologiczne. Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich, jest podzielona na rozdziały, na początku umieszczono wykaz skrótów, wstęp, następnie cel pracy, spis materiałów i metod, wyniki i dyskusję, wnioski oraz spis piśmiennictwa, na końcu streszczenie w języku polskim i angielskim. Praca zawiera 97 stron maszynopisu wraz z 17 rysunkami i 5 tabelami oraz cytowanymi 172 pozycjami piśmiennictwa. We wstępie do rozprawy autor wprowadza do tematyki, uzasadnia logicznie cel badań, po omówieniu anatomii i histologii pęcherza moczowego, opisuje typy nowotworów pęcherza moczowego, ich klasyfikację, epidemiologię i objawy kliniczne, następnie przechodzi do omawiania czynników ryzyka rozwoju raka pęcherza moczowego, w tym czynniki genetyczne, palenie tytoniu, nawyki żywieniowe, związki chemiczne pochodzenia środowiskowego, czynniki biologiczne. Tutaj wymienia zakażenia przywrami *Schistosoma* sp., by przejść do szerszego omówienia zakażeń układu moczowego przez uropatogenne szczepy *E. coli*. Przedstawienie celu badań autor poprzedził uzasadnieniem podjęcia tematu, gdzie podkreśla rolę przewlekłych bakteryjnych infekcji układu moczowo-płciowego w patogenezie raka pęcherza moczowego.

Celem badań jest określenie wpływu komórek *E. coli* na komórki raka pęcherza moczowego, mianowicie autor zaplanował dobrać szczep kliniczny *E. coli* do analiz genomicznych na linii komórkowej raka pęcherza przy pomocy opracowanego testu do identyfikacji *E. coli* w materiale klinicznym biopłatów guza i scharakteryzować izolaty szczepów z cewki moczowej. Ponadto zaplanowano określić wpływ wybranego szczepu na profil ekspresji genów komórek raka pęcherza z zastosowaniem metody mikromacierzy oligonukleotydowych.

W części metodycznej autor zestawiał używane materiały, charakterystykę mikrobiologiczną wymazów, antybiotykowrażliwość izolatów, projektowanie starterów i sond, metodę PCR w czasie rzeczywistym i badanie ekspresji genów metodą PCR i multipleksową PCR, elektroforezy w agarozie, cytometrii przepływowej, analizę transkryptomiczną z zastosowaniem mikromacierzy ekspresyjnej oraz analizę statystyczną uzyskanych danych. Metody są dobrze opisane, przez co rozdział i cała praca, jest logicznym, jednolitym wywodem.

W pierwszym etapie badań zaprojektowano startery do PCR specyficzne dla genu *papI* uropatogennych szczepów *E. coli* i opracowano metodę detekcji tego genu i test oparty na metodzie PCR do szacowania ilości tych drobnoustrojów w biopłatach tkanki nowotworowej pęcherza moczowego i zawartego w nich DNA i RNA oraz w hodowli bakteryjnej wymazu cewki moczowej. Wykazano, że izolaty DNA z fragmentów guzów raka pęcherza zawierały gen *papI* w 79% (27/29) przypadków, z których 83% stwierdzono także gen *papI* w wymazach z cewki moczowej. Ekspresję genu *papI* stwierdzono w 34% przypadków. Następnie przeprowadzono badania zmian ekspresji genów linii komórkowej T24 pęcherza moczowego zainfekowanej uropatogennym szczepem *E. coli* wybranym od pacjenta z rakiem pęcherza. Szczep cechowała ekspresja *papI*, którą stwierdzono też w tkance guza. Analizę wykonano z wykorzystaniem dwukolorowej oligonukleotydowej mikromacierzy ekspresyjnej, pozwalającej na analizę ekspresji tysięcy genów jednocześnie. Pozwoliło to wykryć zależną od tej bakterii zwiększoną ekspresję w poszczególnych genach kodujących białka kilku grup związanych ze składnikami komórkowymi i procesami biologicznymi, cyklem komórkowym i metabolizmem, także, co zauważył autor jako niezwykle istotne, starzeniem komórki. Natomiast zauważona zmniejszona ekspresja przemawia za brakiem wpływu zakażenia *E. coli* na proliferację komórek raka pęcherza. Wyniki mają wartość podstawową, referencyjną w zakresie poznawania mechanizmów wpływu bakterii na proces transformacji nowotworowej.

W dyskusji autor odnosi się właściwie do danych z dobrze dobranego piśmiennictwa, podsumowuje uzyskane wyniki, podejmuje ich wyjaśnienie. Autor interpretuje wyniki analiz ekspresji genów tym, że zakażenie uropatogennymi *E. coli* predysponuje do nowotworzenia

pośrednio poprzez, między innymi, metabolizm mutagenów i kancerogenów. Konkluduje, że przewlekłe i nawracające zakażenia uropatogennymi szczepami *E. coli* mogą przyczyniać się do zmian biochemicznych i genetycznych zainfekowanych komórek pęcherza moczowego i zwiększać ryzyko rozwoju nowotworu. Tutaj nasuwa się pytanie do doktoranta w jakim zakresie wyniki można odnieść do innych gatunków bakterii zidentyfikowanych w bioptatach i odnośnie sugestii na temat starzenia komórki, czy ten proces może prowadzić do lekooporności w terapii nowotworowej, gdyż jego poznanie pozwoliłoby na zaproponowanie celu terapeutycznego i ukierunkowanie badań w szczególności lekooporności bakterii. Należy podkreślić, że autor wykorzystał umiejętnie dostępne narzędzia metodologiczne w swoich badaniach, ostrożnie interpretuje wyniki, opierając się na wynikach własnych zadaje pytania i proponuje dalsze kierunki poszukiwań.

Uwagi krytyczne dotyczą głównie strony redakcyjnej: na stronie 19 ostatnia linia: należy wyjaśnić zmianę Arg156Arg, co oznacza ...ludzie DNA... na Ryc 4, termin ...post PCR... warto zamienić na odpowiednio inny w metodzie 4.8 i na str. 50, w metodzie 4.9 lepiej ...z 1 ml zawiesiny komórek... i na str. 43 ...trzy razy przy pomocy PBS..., na str. 44 ...w ściśle określonych warunkach według protokołu..., na str. 47 ...w tabeli 4... zamiast 5, na str. 49 ...Ryc 6... zamiast 8, na str. 50 lepiej ...na wykrycie *papI* u... choć może być poniżej ...wykazały obecność *papI*..., na Ryc. 9 brak opisu do A i B, na str. 56 ...kontroli (Ryc. 11)... zamiast 12, na str. 60 ...(Rycina 13, klaster 1)..., ...(Rycina 13, klaster 2) powinno być Ryc. 12, rysunek 13 zawiera te same dane powtórzone, na str. 65 powinien być właściwy opis, czyli najpierw Ryc. 17B i poniżej Ryc. 17A, zgodnie z Ryc. 17 na str. 65. Podsumowując, nie mam zasadniczych uwag krytycznych poza wyżej wymienionymi, które nie obniżają dużej wartości pracy, dobrze zaplanowanej i wykonanej. Wyniki przedstawiają cenne dane, które inicjują kierunek dalszych badań. Praca jest oryginalnym wkładem w zakresie nauki podstawowej o potencjalnym znaczeniu praktycznym na polu biomedycznym, przyczynia się do istotnego poszerzenia wiedzy o patomechanizmie nowotworu pęcherza moczowego związanego z tworzeniem się biofilmu bakteryjnego. Autor wykazał się znajomością właściwie wykorzystanego piśmiennictwa, na uwagę zasługuje interesująca koncepcja badań.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Łukasza Madeja zawiera oryginalny materiał doświadczalny i spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz. 574). Wniosuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr Łukasza Madeja do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych
Prof. dr hab. Andrzej Gamian