



WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA
Uniwersytet Łódzki

Łódź, dnia 12 kwietnia 2023 r.

Prof. dr hab. Tomasz Śliwiński
Kierownik Pracowni Genetyki Medycznej
Katedra Genetyki Molekularnej UŁ

O c e n a

pracy doktorskiej mgra Łukasza Madeja

pt.: „*Rola uropatogennych szczepów Escherichia coli w patomechanizmie raka pęcherza moczowego*”

Rak pęcherza moczowego zajmuje czwarte miejsce u mężczyzn i jedenaste u kobiet pod względem zachorowań na nowotwory złośliwe. Każdego roku na świecie diagnozowanych jest ponad 500 tysięcy nowych przypadków tej choroby. Najczęściej raka pęcherza moczowego rozpoznaje się u osób starszych, mediana wieku zachorowania to 73. rok życia. Nowotwór ten cechuje się bardzo dużą tendencją do występowania nawrotów, a przebieg choroby u kobiet jest cięższy niż u mężczyzn. Rak pęcherza moczowego najczęściej wywodzi się z nabłonka przejściowego, który wyściela drogi moczowe, niemniej mogą one również wywodzić się z nabłonka płaskiego i gruczołowego. Nowotwory, które rozwijają się z nabłonka przejściowego nazywane są urotelialnymi. W zależności od stopnia zaawansowania procesu nowotworowego wyróżniamy: guzy naciekające i nienaciekające błony mięśniowej pęcherza moczowego.

Głównym czynnikiem ryzyka wystąpienia raka pęcherza moczowego jest palenie tytoniu, gdzie wdychane toksyny przedostają się z płuc do krwiobiegu, następnie są metabolizowane w wątrobie, po czym są wydalane z moczem. Do pozostałych czynników ryzyka rozwoju raka pęcherza moczowego zaliczamy ekspozycję na karcynogeny przemysłowe, takich jak β-naftalylamina, czy benzydyna oraz stosowanie niektórych leków jak np. cyklofosfamidu. Ryzyko rozwoju nowotworów złośliwych pęcherza moczowego wzrasta u pacjentów z dziedzicznym obciążeniem genetycznym.

Pracownia Genetyki Medycznej, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/143 12/16, 90-236 Łódź, tel. (42) 635 44 86, fax (42) 635 44 84

Kierownik Pracowni: prof. dr hab. Tomasz Śliwiński

Oprócz czynników chemicznych na rozwój raka pęcherza wpływają czynniki biologiczne. Ponad 20% nowotworów w krajach rozwijających się jest spowodowanych infekcjami bakteryjnymi (*Helicobacter pylori*) oraz wirusowymi (wirus Epsteina-Barra).

Istotnym czynnikiem prowadzącym do rozwoju większości nowotworów jest przewlekły, miejscowy stan zapalny. Nawracające zapalenia układu moczowego *Escherichia coli*, ze względu na zmiany procesów biochemicznych oraz indukcje zmian genetycznych może predysponować do rozwoju transformacji nowotworowej. Patogeneza zapaleń układu moczowego (ZUM) wywołana przez uropatogenne szczepy *E. coli* (UPEC) obejmuje następujące po sobie etapy tj. kolonizację okolic cewki moczowej i pochwy z progresją w kierunku cewki moczowej, kolonizację pęcherza moczowego, adhezję do komórek pęcherza moczowego, tworzenie struktury biofilmu, inwazję oraz replikację. Pomimo rozległości wiedzy o czynnikach UPEC pozwalających tym bakteriom na zasiedlanie środowiska układu moczowego, ciągle nie zaproponowano wystarczających procedur diagnostyczno-terapeutycznych pozwalających za uniknięcie tego biologicznego zagrożenia, mogącego wywołać transformację nowotworową.

Bardzo istotnym zatem jest prowadzenie badań w kontekście poszukiwania podejść diagnostycznych w celu wykrycia obecności UPEC oraz liczby bakterii w analizowanej tkance pacjenta, co w konsekwencji pozwoli na dobranie właściwej strategii leczenia tego zakażenia.

Dlatego też, uważam za bardzo zasadne podjęcie badań zaprezentowanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej.

Praca doktorska mgra Łukasza Madeja została wykonana pod kierunkiem Pana Profesora Michała Arabskiego w Zakładzie Biochemii i Genetyki Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach we współpracy z Wojewódzkim Wielospecjalistycznym Centrum Onkologii i Traumatologii im. M. Kopernika w Łodzi.

Układ rozprawy doktorskiej jest o prawidłowy o strukturze tradycyjnej dla prac doświadczalnych. W poniższej recenzji odniosłem się do jej poszczególnych części (rozdziałów):

Cześć teoretyczna

W rozdziale tym, mgr Łukasz Madej w sposób zwięzły, w nawiązaniu do prowadzonych badań, wprowadza czytelnika w zakres tematyczny i cel pracy. W pierwszej części Doktorant charakteryzuje etiologię, podział oraz procedury leczenia raka pęcherza, Następnie Autor skupia się na dokładnym opisie czynników biologicznych mogących prowadzić do transformacji nowotworowej. W kolejnej części mgr Łukasz Madej dokonuje charakterystyki zapaleń układu moczowego, ze szczególnym uwzględnieniem zakażeń wywołanych przez UPEC W rozdziale tym również można zapoznać się z aktualnym stanem wiedzy dotyczącym

skuteczności leczenia tego typu schorzenia. Informacje zawarte w tej części rozprawy oraz sposób ich przedstawienia świadczą o bardzo ugruntowanej, szerokiej wiedzy mgra Łukasza Madeja i mogą one stanowić materiał do napisania doskonałej pracy przeglądowej.

Uzasadnienie i Cel pracy

Cel pracy sformułowany jest w sposób klarowny i jednoznaczny, a była nim ocena efektu uropatogennego szczepu *Escherichia coli* na komórki raka pęcherza moczowego. Na realizację celu pracy składają się dwa zadania szczegółowe:

- wybór klinicznego szczepu UPEC do analiz transkryptomicznych z wykorzystaniem linii T24 raka pęcherza moczowego z w wyniku opracowania testu molekularnego, pozwalającego na identyfikację UPEC w materiale klinicznym, w tym biopsjach guza pęcherza moczowego oraz charakterystykę mikrobiologiczną i genetyczną szczepów UPEC wyizolowanych od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego.
- wybór modelowego, klinicznego szczepu UPEC oraz jego wpływu na profil ekspresji genów komórek raka pęcherza moczowego linii T24. Do osiągnięcia tego celu wykorzystano techniki mikromacierzy oligonukleotydowych.

Podjęcie realizacji celu rozprawy doktorskiej zostało uzasadnione stosownym odniesieniem do danych literaturowych oraz dodatkowo przedstawione w postaci czytelnej grafiki.

Materiały i Metody

Badana populacja obejmowała 29 pacjentów (4 kobiety i 25 mężczyzn) z potwierdzonym histopatologicznie rakiem pęcherza moczowego w wieku od 44 do 86 lat, leczonych w II Klinice Urologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Materiał biopsyjny (tkanka raka pęcherza moczowego) pobrano w trakcie przezcewkowej resekcji pęcherza moczowego od pacjentów leczonych cyprofloksacyną lub amoksycyliną z kwasem klawulonowym.

Wymazy poddane były diagnostyce mikrobiologicznej z zastosowaniem technik hodowlanych i genetycznych. Jednocześnie zostało wyizolowane DNA i RNA z uzyskanych kultur bakteryjnych w celu analizy jakościowej obecności i ekspresji czynników wirulencji szczepów UPEC. Zaprojektowano oraz sprawdzono metodami bioinformatycznymi oraz doświadczalnymi startery i sondę typu TaqMan specyficzną dla genu *papI* w celu jego identyfikacji i oceny ekspresji w analizowanym materiale bakteryjnym i tkankowym guza.

W kolejnym etapie badań oceniono wpływ wybranego, modelowego szczepu UPEC na komórki linii nowotworowej pęcherza moczowego T24 z wykorzystaniem technik cytometrii przepływowej oraz oligonukleotydowej mikromacierzy ekspresyjnej. Uzyskane wyniki poddano analizie bioinformatycznej z wykorzystaniem środowiska programowego języka R wykorzystując pakiety Bioconductor.

Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Etyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (nr. RNN/279/15/KE) i były realizowane we współpracy z prof. dr hab. Waldemarem Różańskim oraz dr hab. Markiem Lipińskim z II Kliniki Urologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Wyniki

Doktorant w usystematyzowany sposób zinterpretował wyniki prac doświadczalnych odnosząc się do kolejnych etapów badań.

Punktem wyjścia w przedstawionych do oceny badaniach było wykazanie zróżnicowania szczepów bakteryjnych wyizolowanych z cewki moczowej 29 pacjentów z rakiem pęcherza moczowego, zidentyfikowane za pomocą testu RapID SS/u oraz podłoża *E. coli* Chromogenic/MacConkey.

W kolejnym etapie badań, zaprojektowane i przetestowane pod względem swoistości startery wykorzystano do detekcji i analizy ekspresji *papI* w materiale klinicznym tj. hodowli bakteryjnej w bulionie TSB wymazu z cewki moczowej oraz tkance nowotworowej pęcherza moczowego.

Pozwoliło to na detekcję genu *papI* UPEC z wykorzystaniem qPCR w materiale izolowanym z hodowli mikrobiologicznej wymazów z cewki moczowej badanej grupy pacjentów oraz na analizy przeprowadzone na izolatach DNA z fragmentów guzów pęcherza moczowego.

Porównując analizowany materiał w 19 przypadkach wynik na obecność *papI* był zbieżny (83 %).

Kolejnym etapem badań była ocena wpływu klinicznego szczepu UPEC na poziom ekspresji genów komórek raka pęcherza moczowego linii T24. W tym celu szczep UPEC wyizolowany od pacjenta nr. 3 wybrano do oznaczeń, jako modelowy (z wykazaną obecnością wszystkich 6 analizowanych czynników patogenności). Eksperyment mający na celu sprawdzenie zmiany ekspresji genów linii komórkowej pęcherza moczowego zainfekowanej UPEC wykonano za pomocą oligonukleotydowej mikromacierzy ekspresyjnej korzystając z środowiska programowego języka R wykorzystując pakiety „BIOCONDUKTOR”.

Analiza ekspresji genów w badanych próbkach pozwoliła na wytypowanie i przyporządkowanie wg. procesów biologicznych, miejsca występowania w komórce oraz wg mechanizmów molekularnych w jakich uczestniczą białka kodowane przez te geny. Natomiast analiza różnicowa wykazała, że nastąpiła zmiana profilu ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za wiązanie innych białek, bądź innych związków.

Podsumowując tę część pracy, kluczowym dla realizacji postawionych celów było:

- opracowanie metody PCR do identyfikacji materiału UPEC w biopatach rak pęcherza moczowego oraz wnikanía bakterii do komórek eukariotycznych linii T24 z zastosowaniem cytometrii przepływowej

- szeroka charakterystyka mikrobiologiczna i genetyczna szczepu UPEC wybranego jako model do badań z zastosowaniem mikromacierzy ekspresyjnej
- wielowątkowa charakterystyka oddziaływań patogenu z gospodarzem poprzez zastosowany panel genów w ramach techniki mikromacierzy

Dyskusja i Wnioski

Właściwie zaplanowany projekt badawczy i jego realizacja z wykorzystaniem odpowiednio dobranych metod, jak również wnikliwa statystyczna ocena otrzymanych wyników zaowocowała uzyskaniem interesujących, oryginalnych ustaleń, m.in.

- identyfikację materiału genetycznego UPEC tj. genu *papI* i jego ekspresji w próbach klinicznych oraz oszacowanie liczby komórek UPEC *papI+* w tkance raka pęcherza moczowego,
- kliniczny szczep *E. coli* scharakteryzowany jako uropatogenny w ramach pracy doktorskiej z wykorzystaniem metod genetycznych oraz mikrobiologicznych technik hodowlanych, wpływa na poziom ekspresji genów komórek nowotworowych linii T24 tj.
- wzrost ekspresji genów kodujących produkty białkowe odpowiedzialne za biosyntezę polisacharydów, pośrednio lub bezpośrednio związane z błoną biologiczną i uczestniczące w transporcie jonów
- obniżenie ekspresji genów kodujących produkty białkowe biorące udział w regulacji ekspresji genów, związane z regulacją czynników transkrypcyjnych i pełniące funkcje molekularne związane z wiązaniem jonów, kwasów nukleinowych i innych białek

Wyniki badań własnych Doktorant zilustrował za pomocą bardzo czytelnych, dobrze wykonanych 13 rycin i jasno opisanych 2 tabel.

Dyskusja jest bardzo silną stroną rozprawy. W tej części pracy Doktorant odnosi się krytycznie to uzyskanych w ramach pracy wyników badań naukowych, konsekwentnie do poszczególnych jej etapów, w zestawieniu do aktualnych danych literaturowych.

Jednak ze względu na pionierskie analizy wykonane w ramach pracy doktorskiej brak jest możliwości ich całkowitego porównania z literaturą światową. Uzyskane wyniki stanowią element poznawczy w zakresie oceny wpływu zakażenia bakteriami UPEC na rozwój raka pęcherza moczowego. Badania te powinny zostać rozszerzone o kolejne etapy profilu biochemicznego komórek nowotworowych w celu bliższego poznania mechanizmów nowotworzenia w badanym typie raka, wywołanym przez czynniki biologiczne tj. UPEC.

W pracy znalazły się nieliczne błędy edytorskie, co na tak obszerną rozprawę (97 str.) jest godne podkreślenia. W tym miejscu z obowiązku recenzenta przedstawiam swoje uwagi oraz sugestie:

- Może warto by było zbadać w przyszłości, czy wyłączenie u bakterii czynników wirulencji tj. *papI* powoduje zahamowanie ich inwazji na komórki prawidłowe nabłonka pęcherza. Pozwoliłoby to może określić czy bakterie takie stają się wrażliwe na leczenie i czy nie wytwarzają alternatywnego mechanizmu zasiedlania tkanek nabłonkowych, który może powodować nowe mechanizmy oporności na antybiotykoterapię?
- Dodatkowo można pokazać jak brak poszczególnych czynników wirulencji UPEC moduluje wpływ tych bakterii na profil ekspresji komórek raka pęcherza.
- Czy istnieje możliwość kontynuacji tych wartościowych badań, skoncentrowanych na zdrożeniu zaproponowanych podejść w celu diagnostyki zapalenia układu moczowego?

Praca ta wpisuje się w ramy samodzielnego rozwiązania projektu badawczego, który w przyszłości może zaowocować stworzeniem nowych podejść zarówno diagnostycznych, jak i terapeutycznych przewlekłego zapalenia układu moczowego, jak również pozwoli przybliżyć mechanizm transformacji nowotworowej komórek pęcherza spowodowany infekcjami UPEC. Przedstawiona do recenzji dysertacja jest wypadkową ogromnego wysiłku włożonego przez jej promotora Pana Profesora Michała Arabskiego oraz Doktoranta.

Niestety ze względów formalnych przyjętych przez Radę Naukową Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach (brak wdrożenia, czy skomercjalizowania wyników uzyskanych w trakcie doktoratu, bądź opublikowania uzyskanych w dysertacji wyników w czasopiśmie z listy JCR) nie mogę wnioskować o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej. Niemniej jednak na szczególne podkreślenie należy zastosowanie w recenzowanej pracy nowatorskiego podejścia do rozwiązywanej kwestii identyfikacji materiału UPEC w biopłatach rak pęcherza moczowego oraz wnikania bakterii do komórek eukariotycznych, jak również wielowątkowej charakterystyki oddziaływań patogenu z gospodarzem. Rozwiązanie to oparte zostało o najnowocześniejsze i bardzo złożone techniki genetyczne i molekularne, wnikliwą analizę rezultatów badań, co może w niedalekiej przyszłości skutkować nowymi rozwiązaniami dla diagnostyki oraz leczenia przewlekłych nawracających zapaleń układu moczowego, pozwalającymi na zapobieżenie powstawania raka pęcherza. Jestem w pełni przekonany, że opisane recenzowanej pracy wyniki znajdą się w najbliższym czasie w formie opublikowanej w prestiżowym czasopiśmie z listy JCR.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgra Łukasza Madeja pt. „Rola uropatogennych szczepów *Escherichia coli* w patomechanizmie raka pęcherza moczowego” stanowi oryginalne rozwiązanie problem naukowego i spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie nauk biologicznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wszystkie moje powyżej przedstawione uwagi dotyczące pracy nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę recenzowanej dysertacji. Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgra Łukasza Madeja do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
PRACOWNI GENETYKI MEDYCZNEJ
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UJ

prof. dr hab. Tomasz Sliwiński