

Warszawa 20.02.2020

Prof. dr hab. Janusz Siedlecki  
Zakład Onkologii Molekularnej i Translacyjnej,  
Narodowy Instytut Onkologii  
im. Marii Skłodowskiej-Curie –  
Państwowy Instytut Badawczy,  
ul. Roentgena 5, 02-784 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

**„Opracowanie mysiego modelu heteroprzeszczepu na przykładzie raka  
jelita grubego”**

Autor: *lek wet. Magdalena Cybulska*

Tworzenie nowego leku przeciwnowotworowego to długa, skomplikowana i bardzo kosztowna droga. Rozpoczyna się od badań podstawowych nad biologią komórek, które uległy transformacji. W dobie technik wielkoskalowych poznanie biologii komórek nowotworowych pozwala na wyodrębnienie cechy lub cech, które mogą np. ograniczyć proliferację lub indukować apoptozę badanych komórek. Stanowią więc podstawę dla poszukiwania czynnika chemicznego o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Wyodrębnienie takiego związku rozpoczyna kolejny etap badania zwany badaniami wczesnej fazy. Na tym etapie badane są: metabolizm czynnika terapeutycznego, jego toksyczność, a także ustala się dopuszczalne dawki badanego związku. Ostatecznym etapem są badania kliniczne, które w kolejnych fazach pozwalają poznać reakcje ludzkiego organizmu na podanie badanego związku i większość z podstawowych objawów ubocznych. Większość, bo ponad 95% testowanych związków kończy swoją karierę najpóźniej na I. lub II. fazie badań

Narodowy Instytut Onkologii  
Im. Marii Skłodowskiej-Curie  
- Państwowy Instytut Badawczy

ul. W.K. Roentgena 5  
02-781 Warszawa

**Dyrekcja**  
Tel.: +48 22 546 22 14  
Fax: +48 22 546 31 90

dyrektor@coi.pl  
www.coi.pl

**Centrala**  
Tel.: +48 22 546 20 00  
Fax: +48 22 546 33 00

NIP: 5250008057  
REGON: 000288366

klinicznych. Jedynie niewielki procent badanych związków zostaje dopuszczony do badania klinicznego III fazy na dużej grupie chorych. Gdy ten egzamin wypadnie pozytywnie specjalny urząd powtórnie ocenia przebieg całego procesu i w przypadku, gdy spełnione są wszystkie obowiązujące kryteria dopuszczenia leku do stosowania u ludzi wpisuje badany związek na listę stosowanych leków. W ciągu ostatnich lat dzięki unowocześnieniu metod biologii molekularnej poprawiła się nasza znajomość biologii nowotworów. Coraz częściej zdajemy sobie sprawę z heterogenności nowotworów. Niestety większość dzisiejszych metod diagnostycznych nie pozwala na segregację pacjentów do odpowiednich grup terapeutycznych. Kryteria selekcji są dalece niewystarczające, a co za tym idzie terapia jaką pacjent otrzymuje nie jest optymalna. Dlatego konieczne jest opracowanie metody, dzięki której fragment guza pobranego od pacjenta może być poddany w organizmie biorcy procesowi wyboru optymalnego leczenia. Taki model musi jednak spełniać dwa podstawowe warunki: po pierwsze pobrany fragment guza musi być wszczepiony do organizmu modelowego i po drugie wszczepiony fragment guza musi się namnażać w organizmie biorcy. Oznacza to, że biorca nie może odrzucić przeszczepu. Wyborem jest praca z organizmem, w którym system immunologiczny biorcy jest uszkodzony. W praktyce oznacza to, że fragment guza nowotworowego wszczepiany jest do organizmu myszy z defektem immunologicznym. Powstający heteroprzeszczep (ludzki guz w organizmie myszy) może rosnąć przez jakiś czas i stanowić dobry model dla wyboru najbardziej odpowiedniej terapii.

Przedstawiona mi do recenzji praca jest opisem własnych dokonań przy tworzeniu tego nowoczesnego modelu. Ma ona trochę nietypowy charakter. Jej pierwsza część opisuje zmagania autorki z opracowaniem modelu heteroprzeszczepów raka jelita grubego (RJG) wyprowadzonego bezpośrednio z tkanki guza nowotworowego pacjenta. W drugiej części autorka analizuje zmiany jakie zachodzą w guzie w trakcie hodowli w kolejnych generacjach biorcy (myszy z defektem w systemie immunologicznym). Zdaniem autorki opracowany model może służyć do odtworzenia guza ludzkiego poza organizmem chorego. Dzięki

takiemu modelowi możemy z jednej strony próbować podzielić heteroprzeszczepy od pacjentów na podgrupy o określonym typie przebiegu choroby, z drugiej zaś wytestować jak określony typ przebiegu choroby będzie reagował na wybraną terapię. Innymi słowy, w oparciu o model kserograftów mamy szansę na znaczącą personalizację procesu leczenia. Heteroprzeszczepy tworzone były zarówno z ludzkich linii komórkowych raka jelita grubego (CLX) jak też z tkanki guza chorego na raka jelita grubego (PDX). Wszystkie ludzkie linie raka jelita grubego zakupione były w ATCC i były hodowane w warunkach zalecanych przez sprzedawcę. Heteroprzeszczepy raka jelita grubego wykonywano w myszach z defektem immunologicznym NU/J (tzw. myszy nagie) obu płci w wieku 6 do 20 tygodni. Heteroprzeszczepy innych nowotworów próbowano też wykonywać korzystając z myszy NSG/J. Wszystkie zwierzęta utrzymywano i hodowano w zwierzętarni Zakładu Genetyki w specjalnych pomieszczeniach w ściśle kontrolowanych warunkach zgodnie z procedurą zatwierdzoną przez odpowiednią Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach. Woda i pokarm dostarczane były *ad libitum*. Gdy wszczepiony guz przekroczył 500 mm<sup>3</sup> zwierzę poddawano eutanazji a guz wycinano i przeszczepiano go po obu stronach ciała zwierzęcia kolejnym 2-3 myszom. Proces powtarzano aż do szóstego pasażu pobierając przy każdym kolejnym przeszczepieniu próbki guza do badania. Do badań molekularnych próbki guza były zamrażane w -80°C. Badania histologiczne i immunohistochemiczne były przeprowadzane w pasażu pierwszym i drugim. Równolegle materiał z kolejnych przeszczepów bankowano w ciekłym azocie tworząc bank PDX (alternatywnie CLX).

DNA i RNA z guzów z heteroprzeszczepów na etapie P2 izolowano z wykorzystaniem standardowych zestawów. Biblioteki do sekwencjonowania tworzone z wykorzystaniem odczynników (zestawów) firmy Thermo Fisher Scientific.

Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej z wykorzystaniem specjalistycznego oprogramowania.

W latach 2014-2018 wykonano 179 przeszczepień, z czego 63 stanowiły raki jelita grubego. Spośród przeszczepianych raków jelita grubego w 32 przypadkach wyprowadzono 32 heteroprzeszczepy. Udało się też uzyskać heteroprzeszczepy guzów od pacjentów z rakami ginekologicznymi, żołądka, pęcherza moczowego, czerniaka, raka płuca i mięsaków. Odsetek wyprowadzania heteroprzeszczepów zależał od typu nowotworu. W przypadku RJG wynosił 51%. Tempo wzrostu heteroprzeszczepu dla RJG było bardzo zróżnicowane i wahało się od 35 do 225 dni. Nie udało się wyjaśnić przyczyny takiego zróżnicowania. W przypadku CLX dla ludzkich linii RJG czas potrzebny do uzyskania objętości 500 mm<sup>3</sup> też był różnicowany, ale ogólnie nieco krótszy.

Badania histologiczne wykazały, że heteroprzeszczepy miały charakterystykę zbliżoną do tkanki guza. Stopień złośliwości w większości przypadków zawierał się między grade 2-3 i był podobny do guza pierwotnego. Heteroprzeszczepy z linii komórkowej i ich kolejne pasaży charakteryzowały się wysokim stopniem złośliwości. Badania IHC pozwalały na stwierdzenie niemal całkowitego zastąpienia zrębu ludzkiego zrębem mysim. Potwierdzono natomiast ludzkie pochodzenie komórek nowotworowych.

Porównawcza analiza molekularna z wykorzystaniem panelu 409 genów między guzem a wyprowadzonymi z nich heteroprzeszczepami wykazała aż 2832 pojedyncze zmiany. Warianty wykazano w 366 genach. Najczęściej obserwowane zmiany to mutacje w genach typu „driver”. Zmiany występujące w heteroprzeszczepie P2 w prawie 60% były zgodne ze zmianami obserwowanymi w guzie, z którego heteroprzeszczep wyprowadzono. Badania transkryptomyczne przeprowadzone na tym samym materiale (guz i heteroprzeszczep P2) wykazały spadek ekspresji 3262 genów i wzrost ekspresji 918 genów. Geny o istotnie zwiększonej ekspresji odpowiadały szlakom powiązanym z metabolizmem glukozy, a geny o znacząco zmniejszonej ekspresji były powiązane z organizacją macierzy zewnątrzkomórkowej, odpowiedzią immunologiczną i angiogenezą.

Niezwykle ciekawa jest dyskusja na temat prób podziału na podstawie analizy transkryptomnicznej na cztery molekularnie różnicujące typy raka jelita grubego w oparciu o stosowany w literaturze klasyfikator. Otrzymane heteroprzeszczepy jedynie częściowo udało się przypisać do określonych grup molekularnych. Zastosowanie dwóch innych klasyfikatorów opisanych w literaturze również nie pozwoliło na przypisanie heteroprzeszczepów P2 do grup identycznych z tymi przypisanymi do tkanek z guzów. Spośród czterech różnych klasyfikatorów stosowanych w tej pracy klasyfikator PDX pozwalał w najbardziej przybliżony sposób przyporządkować badane heteroprzeszczepy do tych samych grup, do których przypisano tkanki guza. Zgodność przy zastosowaniu tego klasyfikatora wynosiła 75%.

Zamrożony w ciekłym azocie materiał z kolejnych pasażów heteroprzeszczepów z RJG po rozmrożeniu i wszczepieniu do myszy z defektem immunologicznym wykazywał wzrost niezależnie od etapu pasażowania.

Dyskusja w tej pracy jest niezwykle starannie przeprowadzona. Na tle literaturowych danych przedstawione są wyniki własne. Autorka podkreśla, że w warunkach przez nią opracowanych odsetek utworzonych heteroprzeszczepów uzależniony był głównie od typu nowotworu. W przypadku raka jelita grubego odsetek utworzonych heteroprzeszczepów wahał się od 30 do 75%. Niestety brak mi w dyskusji rozważań, nawet akademickich, nad przyczynami tego zjawiska. Szczególnie w świetle obserwowanej przez doktorantkę wymiany ludzkiego mikrośrodowiska na mysie.

Pracę kończą dwa wnioski z których wniosek pierwszy można uznać za próbę powołania w oparciu o uzyskane wyniki pracowni lub innej jednostki organizacyjnej, która z jednej strony mogłaby służyć do prowadzenia badań przedklinicznych nowoopracowanych leków przeciwnowotworowych (i nie tylko), a z drugiej mogłaby być wykorzystana w procesie personalizacji terapii. W tym drugim przypadku biobank heteroprzeszczepów różnych PDX (i ewentualnie CLX) byłby szczególnie przydatny.

Podsumowując, uważam, że Pani Magdalena Cybulska osiągnęła stawiane sobie cele. Opracowała metodę hodowli heteroprzeszczepów w myszach z nieprawidłowo działającym systemem immunologicznym. Wykazała, że możliwe jest utrzymanie w hodowli kolejnych pasaży oraz, że przynajmniej wczesne pasaży wykazują pod względem histologicznym i molekularnym około 60% podobieństwo do guza pierwotnego. Kolejne pasaży można zamrażać i rozmrażać nawet po długim okresie. Po rozmrożeniu i wszczępieniu do nagiej myszy można je dalej pasażować. Doktorantka wykazała więc również, że możliwe jest utworzenie banku heteroprzeszczepów. Zamrożone i rozmrożone heteroprzeszczepy (PDX z kolejnych pasaży) nadal zachowują zmiany obserwowane w guzie pierwotnym, co czyni je przydatnymi zarówno w badaniach nowych leków przeciwnowotworowych (i nie tylko), ale także w procesie personalizacji procesu leczenia. Dlatego wnioskuję do Rady Naukowej CMKP o dopuszczenie autorki pracy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wartości poznawcze tej pracy oraz na potencjalne możliwości wykorzystania ich w klinice wnioskuję o wyróżnienie tej pracy.

  
Kierownik  
Zakładu Histologii  
Molekularnej i Translacyjnej

*Prof. dr hab. n. med. Janusz Siedlecki*