

Ocena rozprawy doktorskiej na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu mgr Darii Witkowskiej pt. „Wpływ wisfatyny na poziom reaktywnych form tlenu oraz apoptozę ludzkich komórek raka okrężnicy linii Caco-2 *in vitro*”



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Rak jelita grubego jest najczęstszym nowotworem złośliwym przewodu pokarmowego na świecie oraz trzecim co do częstości występowania nowotworem złośliwym w Polsce u obu płci, a każdego roku rozpoznaje się około 16 tysięcy nowych przypadków w Polsce. Obecnie nastąpił prawie 4-krotny wzrost liczby zachorowań u mężczyzn i prawie 3-krotny wzrost zachorowania u kobiet, obserwowany od 1980 roku. Rak jelita grubego jest także drugim nowotworem złośliwym pod względem umieralności w Polsce u obu płci. W przypadku nowotworów złośliwych jelita grubego o skuteczności leczenia decyduje stadium rozwoju choroby, wczesne rozpoznanie oraz efektywność zastosowanych metod. Dokładna znajomość czynników ryzyka predysponujących do rozwoju tego typu nowotworu może skutecznie zmniejszyć ilość nowych przypadków. Niestety, dokładna etiologia nowotworów jelita grubego nie została dostatecznie poznana. Wyróżnia się kilka kategorii czynników sprzyjających zapoczątkowaniu rozwoju raka jelita grubego. Są to między innymi czynniki środowiskowe, w tym dietetyczne, epidemiologiczne lub/i współwystępowanie niektórych chorób np. stany zapalne jelit, występowanie polipów gruczołowych a także czynniki genetyczne i epigenetyczne. Do przyczyn epidemiologicznych zaliczamy wiek. Jednym z czynników mogących zwiększać ryzyko wystąpienia tego typu nowotworu jest dieta uboga w składniki o działaniu przeciwutleniającym, a jednym z mechanizmów prowadzącym do procesów karcinogenezy jest szkodliwy wpływ reaktywnych form tlenu.

Otyłość jest czynnikiem zwiększającym ryzyko rozwoju nowotworów złośliwych przewodu pokarmowego, w tym jelita grubego, jest także powiązana z szybszą progresją choroby nowotworowej. Jedną z adipocytokin – wisfatyna, jest białkiem pochodzącym z tkanki tłuszczowej zarówno trzewnej, jak i podskórnej i jest związana z chorobami metabolicznymi towarzyszącymi otyłości. Wiele badań epidemiologicznych wykazuje dodatnią korelację między otyłością a zwiększonym ryzykiem rozwoju nowotworów jelita grubego. Rola i korelacja między wisfatyną, a reaktywnymi formami tlenu i niektórymi cytokinami oraz ich wpływ na mechanizm apoptozy komórek raka jelita grubego jest aktualnie przedmiotem badań naukowych,

Wydział Lekarski

Katedra Fizjologii

ul. Grzegorzewska 16

PL 31-531 Kraków

tel. +48(12) 421 10 06

+48(12) 619 96 30

fax +48(12) 422 20 14

fizjologia@cm-uj.krakow.pl

ze względu na możliwość opracowania nowych metod diagnostyki raków jelita grubego.

Wyjaśnianie zależności pomiędzy różnymi czynnikami mogącymi brać udział w powstawaniu, progresji oraz skutecznej terapii nowotworów jest dążeniem wielu badaczy zajmujących się tymi problemami. Dlatego też przedłożoną mi do oceny rozprawę uważam za niezwykle istotny wkład do badań klinicznych. Wybór takiego tematu przez Doktorantkę uważam za bardzo aktualny, nowoczesny i głęboko uzasadniony.

Przedstawiona mi do oceny dysertacja liczy 64 strony wydruku komputerowego, posiada typowy dla tego rodzaju prac układ redakcyjny, zawiera wykaz skrótów, spis tabel i rycin, szeroko rozbudowany wstęp, cele i założenia pracy, materiał i metody badań własnych, wyniki, wnioski, dyskusję, piśmiennictwo liczące 139 pozycji oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Praca pochodzi z Katedry i Zakładu Fizjologii Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, której kierownikiem jest prof. dr hab. n. med. Jerzy Jochem, a została wykonana pod kierownictwem prof. dr hab. n. med. Krystyny Żwirskiej-Korczał, wieloletniego kierownika tej katedry, autorytetu w dziedzinie fizjologii, szczególnie fizjologii komórki, a także cenionego badacza, uznanego w kraju oraz rozpoznawalnego na forum międzynarodowym.

W rozbudowanym, logicznie zaplanowanym wstępie Doktorantka przypomina szczegółowo między innymi wyniki dotychczasowych obserwacji na temat epidemiologii i etiologii nowotworów jelita grubego, wpływu otyłości brzusznej na ryzyko rozwoju nowotworów, wpływu adipocytokin, stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego na ryzyko rozwoju i progresję nowotworów oraz omawia aktualny stan wiedzy na temat roli wisfatyny w nowotworach. Zwraca uwagę na niejasności i kontrowersje w literaturze tego tematu. Autorka głęboko wnika w fizjologię tematu, wzbogacając treść informacjami na temat nowych badań, co osobiście dla recenzenta jest szczególnie cennym. Jasno przedstawia znaczenie szeregu patologii, jakie mogą znaleźć się w omawianych procesach w przebiegu transformacji nowotworowej. Lektura tego rozdziału świadczy o rzetelnej znajomości przez Autorkę współczesnego piśmiennictwa dotyczącego poruszanych zagadnień. Dobór pozycji literatury uważam za właściwy, z satysfakcją stwierdzam, że większość pozycji piśmiennictwa uwzględnia najnowsze doniesienia z zakresu omawianego tematu.

W rozdziale nt. celu pracy Autorka zwięźle przedstawia założenia pracy, a były to: (1) Określenie żywotności oraz odsetka komórek apoptotycznych i nekrotycznych w hodowli komórek ludzkiego raka okrężnicy linii Caco-2 *in vitro* stymulowanych wisfatyną w różnych stężeniach, (2) Ocena wpływu wisfatyny na wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT)

w tym anionorodnika ponadtlennkowego w komórkach ludzkiego raka okrężnicy linii Caco-2 *in vitro*, (3) Ocena stężenia cytokin pozapalnych TNF- α , IL-1 β w supernatantach pochodzących z komórek ludzkiego raka okrężnicy linii Caco-2 poddanych stymulacji wisfatyną w różnych stężeniach.

W rozprawie wykorzystano do badań materiał pochodzący z komórek ludzkiego raka okrężnicy linii Caco-2, pochodzących z kolekcji ATCC: HTB37 ludzkiego gruczolakoraka okrężnicy (*adencarcinoma*). Badania przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Fizjologii, Biochemii Ogólnej w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach oraz w Zakładzie Inżynierii Systemów, Instytutu Automatyki, Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Powyższe badania zostały sfinansowane ze środków Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach – umowa nr KNW-2-009/N/3/N, co spełnia wszystkie wymogi natury formalnej. Hodowlę komórkową prowadzono na pożywce EMEM, wzbogaconej 10% surowicą wołową. Komórki następnie poddano stymulacji wisfatyną. Oznaczano pomiar żywotności komórek z wykorzystaniem aktywności oksydoredukcyjnej mitochondriów – test MTS, detekcję reaktywnych form tlenu (RFT), anionorodnika ponadtlennkowego w komórkach ludzkiego raka okrężnicy linii Caco-2 *in vitro* oraz detekcję komórek apoptotycznych i nekrotycznych z użyciem cytometrii przepływowej oraz oznaczono stężenie cytokin TNF- α i IL-1 β w supernatantach komórek linii Caco-2 *in vitro*. Następnie wyniki poddano analizie statystycznej. Metodyka badań nie budzi moich zastrzeżeń.

W następnej części pracy Autorka omawia wyniki swoich badań. Wyniki te są szczegółowo przedstawione na załączonych rycinach i tabelach. Całość wyników przedstawiona została z podziałem na podrozdziały zgodnie z planowanymi badaniami. Osobno omówione zostały wyniki poszczególnych badań z uwzględnieniem mierzonych parametrów.

W szczegółowej dyskusji Autorka podsumowuje aktualną wiedzę na temat wisfatyny i jej wpływu na progresję nowotworów – w tym na procesy angiogenezy, apoptozy, nekrozy, inwazji i przerzutowania oraz wynikające z tego implikacje kliniczne, które to są przedmiotem zainteresowania wielu badaczy. Stara się przybliżyć i wyjaśnić znaczenie stresu oksydacyjnego indukowanego wisfatyną, który wpływa na ryzyko rozwoju i progresję nowotworów jelita grubego. Prawidłowo interpretuje uzyskane wyniki i porównuje je z dostępnym piśmiennictwem. Podkreśla znaczenie oceny wysokiego stężenia białka wisfatyny obserwowane w surowicy/osoczu krwi pacjentów z nowotworami jelita grubego oraz innych typach nowotworów mogące wynikać, z większej ekspresji genu kodującego wisfatynę/iNamp1 w tkance guza oraz nasilenia wydzielania tego białka do krwioobiegu.

Należy też zaznaczyć, że Autorka w sposób wyważony omawia własne wyniki na tle doniesień innych autorów. Omówienie wyników i dyskusja przeprowadzone są rzeczowo, analitycznie, ze znanstwem problemu. Autorka kolejno omawia wyniki swoich obserwacji, odnosząc je do aktualnych danych z literatury. Krytycznie ocenia i wyjaśnia wątpliwości, jakie mogłyby się nasunąć po przeczytaniu jedynie wyników pracy. Rozdział ten też sugeruje drogę, jaka doprowadziła Autorkę do ostatecznych wniosków.

Wnioski, zawarte w 3 punktach, klarownie przedstawione przez Doktorantkę, są w pełni uzasadnione wynikami przeprowadzonych badań. Wszystkie wydają się być istotne: (1) Największe obniżenie żywotności i wzrostu odsetka komórek apoptotycznych w hodowli obserwowano w grupie komórek linii Caco-2 stymulowanych wisfatyną w najniższych testowanych stężeniach (0,1; 10 ng/ml). Przeciwny efekt, niewielki wzrost żywotności komórek i obniżenie ilości komórek apoptotycznych obserwowano, gdy komórki stymulowano wisfatyną w stężeniu 100 ng/ml (efekt antyapoptotyczny wisfatyny); (2) Zmiany stężenia RFT w ludzkich komórkach raka okrężnicy linii Caco-02 są zależne od użytego stężenia wisfatyny (wzrost poziomu RTF, w tym anionorodnika ponadtlennkowego, obserwowany w grupie stymulowanej wisfatyną w stężeniu 0,1 i 10 ng/ml, obniżenie tego poziomu w grupie komórek traktowanych wisfatyną w stężeniu 100 ng/ml); (3) Obserwowano wzrost stężenia cytokin zapalnych TNF- α i IL-1 β w supernatantach z nad hodowli ludzkich komórek linii Caco-2 stymulowanych wisfatyną w stężeniu 0,1 i 10 ng/ml, obniżenie stężenia tych cytokin obserwowane było, gdy komórki stymulowano wisfatyną w stężeniu 100 g/ml. Wnioski te zdecydowanie odpowiadają określonym na początku celom pracy, stanowią ich rozwinięcie, a nade wszystko prezentują czytelnie sprecyzowany aspekt biochemiczny, kliniczny oraz praktyczny. Sformułowane są w sposób ostrożny, dojrzały i dobitnie sugerują konieczność kontynuowania dalszych badań.

Czytając tekst pracy doktorskiej mgr Darii Witkowskiej z przyjemnością stwierdzam, że nie mam żadnych krytycznych uwag, które mogłyby się nasunąć podczas analizy przedstawionej rozprawy. Praca ta stanowi przykład świetnie zaprojektowanego i przeprowadzonego badania, które stanowi wzorowe rozwiązanie problemu naukowego. Drobne błędy literowe, gramatyczne i interpunkcyjne, jako niemające nic wspólnego z wartością merytoryczną pracy, pozwalam sobie pominąć.

Omawiana praca mgr Darii Witkowskiej przedstawia wyniki badań, które mają znaczenie w rozwoju nowych metod badań diagnostycznych oraz zawiera ważne elementy poznawcze. Praca ta jest interesująca i wartościowa, a wyniki przedstawione w niej posiadają potencjał istotnego znaczenia praktycznego w diagnostyce klinicznej oraz onkologii.

Doktorantka wykazała się biegłością w wykorzystywaniu swoich umiejętności do celów naukowych, zdolnością do pracy badawczej i do krytycznego podejścia do osiągniętych wyników badań. Autorka dogłębnie zapoznała się ze współczesnym piśmiennictwem dotyczącym tematu pracy i co więcej, wykazała się umiejętnością właściwego wykorzystywania go do założonych celów.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa jest rezultatem solidnego, nowoczesnego warsztatu naukowego, a nade wszystko została przygotowana rzetelnie, czytelnie, przejrzysto, napisana poprawną polszczyzną, a ryciny i tabele są dodatkowymi walorami pracy. Jako recenzent mam świadomość, że zastosowane badania i oznaczenia są żmudne i wymagają dobrej orientacji w temacie. Pracę oceniam wysoce pozytywnie i uważam za odpowiadającą w pełni wymogom stawianym rozprawom doktorskim oraz warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki”.

Biorąc powyższe pod uwagę z najwyższą przyjemnością przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach wniosek o dopuszczenie mgr Darii Witkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Ze względu na nowatorstwo oraz wiele wcześniej wymienionych przeze mnie cech omawianej pracy stawiam również wniosek o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Piotr Ceranowicz

prof. dr hab. n. med. Piotr Ceranowicz

Kraków, 16.09.2019 r.