

Kraków, 4 marca 2021 r.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI

COLLEGIUM
MEDICUM

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Marty Podgórskiej

pt. „Wpływ apeliny na rozwój raka jelita grubego”

Charakterystyka formalna rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Marty Podgórskiej pt. „Wpływ apeliny na rozwój raka jelita grubego” stanowi stu czterdziestotrzystronicowe opracowanie wyników badań prowadzonych przez doktorantkę w Zakładzie Patologii Komórki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Promotorem pracy była kierująca Zakładem dr hab. Dorota Nowak, prof. UW, a promotorem pomocniczym dr Katarzyna Pietraszek-Gremplewicz. Zasadniczym celem przedstawionych w rozprawie badań, prowadzonych w ramach realizacji grantu NCN, którego kierownikiem była dr K. Pietraszek-Gremplewicz i w nawiązaniu do niego, było określenie czy i ewentualnie w jaki sposób apelina przyczynia się do rozwoju raka jelita grubego. Znaczna część wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej została opublikowana w formie czterech prac w czasopismach z IF, których doktorantka jest pierwszym autorem. Bardzo dobrze świadczy to o aktualności i znaczeniu podjętych badań. Obiecujące wyniki zostały m.in. dostrzeżone przez redaktorów Encyclopedia of Molecular Pharmacology (2020). Praca ma na tym etapie charakter głównie poznawczy, ale nie ulega wątpliwości, że badaniom przyświeca również cel kliniczny – poszukiwanie nowych molekularnych celów terapeutycznych powiązanych z badanym mechanizmem działania apeliny, których traktowanie zwiększałoby efektywność leczenia raka jelita grubego.

Rak jelita grubego jest zarówno u kobiet, jak i mężczyzn jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów znajdującym się w zależności od badanej populacji/kraju na drugim lub trzecim miejscu listy rejestrowanych

Wydział Lekarski

Katedra

Biochemii Lekarskiej

ul. Kopernika 7

PL 31-034 Kraków

tel./fax +48 12 422 32 72

+48 12 422 74 00

+48 12 424 72 29

kbl_sekr@cm-uj.krakow.pl

www.biochemia.cm-uj.krakow.pl

i prognozowanych zachorowań. Z tego też powodu należy do intensywnie badanych problemów medycznych, który doczekał się w literaturze niezliczonej niemal ilości opracowań. Poznane są też występujące w dużej liczbie przypadków i kojarzone z jego rozwojem mutacje genu supresorowego APC identyfikowane u ponad 80% chorujących na sporadycznego raka jelita grubego, jak również niestabilności chromosomowe oraz będące konsekwencją zarówno jednych jak i drugich zaburzenia funkcjonowania licznych szlaków sygnalizacyjnych komórek nabłonka jelita grubego. Podstawowy sposób postępowania wymaga operacyjnego usunięcia wykrytego guza i w zależności od licznych, w tym i molekularnych uwarunkowań, ewentualnego zastosowania radio- i / lub chemioterapii. Tak więc znajomość czynników sprzyjających rozwojowi choroby na poziomie molekularnym ma nadal ogromne znaczenie, a od czasu rozpoznania niekorzystnego wpływu otyłości na powstawanie i przebieg tej choroby wszelkie szczegółowe badania nad adipokinami, w kontekście ich ewentualnego udziału w rozwoju procesu nowotworowego, niosą w sobie potencjał terapeutyczny i mają wielkie znaczenie. Tym samym badania przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr Marty Podgórskiej są jak najbardziej aktualne i dobrze wpisują się w profil zagadnień będących przedmiotem studiów w kierowanym przez prof. Dorotę Nowak Zakładzie Patologii Komórki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Charakterystyka merytoryczna rozprawy

Praca doktorska jest napisana czytelnie. Została też starannie przygotowana od strony wydawniczej, w typowy dla większości analogicznych opracowań sposób, z podziałem na rozdziały i gdzie to konieczne podrozdziały. Obejmuje 143 strony tekstu, w tym:

- (i) Stronę wstępną i dedykację,
- (ii) Spis treści (3 strony),
- (iii) Streszczenie w j. polskim (1,5 strony) i jego tłumaczenie na j. angielski (Abstract) z bardzo zwięzłym przedstawieniem najważniejszych informacji dotyczących pracy doktorskiej, jak zasadność wyboru tematu, cel, uzyskane wyniki oraz podsumowanie/wnioski,
- (iv) Spis najważniejszych skrótów (5 stron),
- (v) 1. Wstęp (27 stron, 13 rysunków, 4 tabele) – omawiający pod kątem zaprojektowanych badań i mający za zadanie przekonanie czytelnika do zasadności ich podjęcia: w niezbyt rozbudowanej formie aktualny stan wiedzy odnośnie raka jelita grubego i procesu nowotworzenia (1.1-1.2), a następnie dość wnikliwie

- potencjalny udział otyłości w tym procesie (1.3.1-1.3.5), w tym rolę adipokin (1.4), a w sposób bardzo szczegółowy udział apeliny (1.5) zarówno w podstawowych procesach fizjologicznych i w stanach patologicznych (1.5.1-1.5.2.5) z nowotworzeniem włącznie (1.5.2.6); 201/243 (83%) cytowanych prac,
- (vi) 2. Cel pracy (1 strona) – opisany bardzo krótko, ale klarownie i wystarczająco z zasygnalizowaniem metodologii badawczej,
 - (vii) 3. Materiały i odczynniki (12 stron, 3 rysunki, 8 tabel) – opis materiału pochodzącego od pacjentów (56 osób z histopatologicznie potwierdzonym rakiem jelita grubego - próbki krwi, tkanki guza oraz tkanki prawidłowe) oraz zdrowych dawców (27 osób, próbki krwi), badanych linii komórek raka jelita grubego, ludzkich preadipocytów i HUVEC, odczynników, pożywek, plazmidów, shRNA, zestawów analitycznych, buforów etc. oraz stosowanej aparatury badawczej i oprogramowania,
 - (viii) 4. Metody (12 stron, 2 rysunki) – szczegółowy opis licznych zastosowanych technik badawczych biochemii, biologii komórki i molekularnej oraz biotechnologii wykorzystanych w realizacji części eksperymentalnej pracy oraz w celu analizy statystycznej otrzymywanych wyników,
 - (ix) 5. Wyniki (50 stron, 39 rysunków z uwzględnieniem materiału zdjęciowego, 4 tabele) – prezentacja wyników i ich opis wraz z niezbędnym krótkim komentarzem,
 - (x) 6. Wnioski (2 strony, 1 rysunek) – stanowią podsumowanie najważniejszych osiągnięć oraz stwierdzenia o charakterze wniosków,
 - (xi) 7. Dyskusja (11 stron) – omówienie otrzymanych wyników w świetle dostępnej aktualnie i użytej na poparcie przedstawianej ich interpretacji oraz wniosków literatury dotyczącej badanych w pracy zagadnień; (część ta charakteryzuje się procentowo największym udziałem prac z ostatnich 3 lat),
 - (xii) 8. Podziękowania (1 strona),
 - (xiii) 9. Literatura, zawierająca 243 pozycje w tym: 88 pozycji do roku 2010 i z lat wcześniejszych, 93 pozycje z lat 2011 – 2015, 36 pozycji z lat 2016 – 2017 i 25 pozycji od roku 2018 do chwili obecnej (w sumie blisko 25% z ostatnich pięciu lat).

Do pracy załączona jest kartka pt. Lista publikacji z udziałem doktorantki oraz dysk CD ze zdjęciami (3 zdjęcia będące częścią rysunków 31, 40 i 46 zamieszczonych w pracy doktorskiej i 4 filmami obrazującymi w czasie rzeczywistym powstawanie wypustek

migracyjnych w komórkach linii raka jelita grubego LS180 traktowanych apeliną-36 (A36) oraz antagonistą jej receptora APJ (ML221), a także transfekowanych genem receptora (*APLNR*) oraz z wyciszonym genem apeliny *APLN* (shAPLN).

Fakt, że doktorantka jest pierwszym autorem czterech prac opublikowanych w latach 2018-2021 – prezentujących wyniki zamieszczone i dyskutowane również w pracy doktorskiej – jednoznacznie świadczy o Jej istotnej roli w realizowanych badaniach i w przygotowaniu publikacji. Założyć należy, że osobiście przeprowadziła zdecydowaną większość omawianych eksperymentów, albo uczestniczyła w znaczącym wymiarze w ich wykonaniu.

Wnikliwe zapoznanie się z rozprawą doktorską mgr Marty Podgórskiej zmusza mnie jednak jako recenzenta do sformułowania kilku uwag oraz zadania pytań, celem wyjaśnienia pewnych wątpliwości czy niejasności:

1. rozdział rozprawy pt. Wstęp jest napisany przystępnie, a główny akcent, co jest zresztą zrozumiałe, położony na apelinę choć w nadmiernie według mnie rozbudowanym zakresie odnośnie jej roli w chorobach układu sercowo-naczyniowego, niedotlenieniu, otyłości, angiogenezie, cukrzycy typu II uzupełniony licznymi, dość podobnymi schematami (Rys. 8 - 12). Można byłoby je zastąpić schematem podobnym do przedstawionego na Rys. 13, zbiorczo traktującym szlaki sygnalizacyjne wielce prawdopodobnie zaangażowane w mechanizm działania apeliny w procesie powstawania i rozwoju nowotworu (Wstęp, str. 39). Ponadto bardziej zasadne wydaje się użycie na str. 18 w ostatnim akapicie poświęconym cukrzycy typu II (5 linijka od dołu) słowa zaburzeniem w miejsce słowa upośledzeniem, gdyż patologia ta wiąże się nie tylko z upośledzeniem wydzielania insuliny, ale i z insulinoopornością,
2. wysoko oceniam opracowanie części rozprawy Materiały i Odczynniki oraz Metody. Napisana została klarownie i wyczerpująco. Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest dobrym przykładem wielowątkowego podejścia do badanego tematu. Jej realizacja wymagała od doktorantki zastosowania szerokiego spektrum metod badawczych oraz technik analitycznych wykorzystywanych w biochemii, biologii komórki i molekularnej oraz biotechnologii. Niewątpliwą atrakcją są też załączone do rozprawy doktorskiej doskonałej jakości zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego, a zwłaszcza filmy obrazujące powstawanie wypustek migracyjnych w żywych komórkach. Z obowiązku spoczywającego na recenzencie chciałbym jedynie zwrócić uwagę na przeoczenie faktu, że w opisie metody western blot doktorantka napisała, że stosowała bufor do transferu, a w spisie odczynników był podany skład kupowanego

buforu 10-ciokrotnie stężonego, i nigdzie nie wspomniała, że należy przygotowując finalny roztwór dodać jeszcze metanol,

3. niezrozumiałym jest dla mnie fakt nieco odmiennego potraktowania w rozprawie doktorskiej wspomnianych powyżej 4 opublikowanych prac. Praca o charakterze przeglądowym opublikowana w 2018 r (M. Wysocka et al., *Front. Physiol.* 2018) została uwzględniona zarówno w spisie pozycji, do których doktorantka odwołuje się w rozprawie (Literatura, str. 127-143) oraz w podpisach rysunków i tabel (Wstęp, Rys. 5, Tabele 2 - 4) przygotowanych na użytek rozprawy w nawiązaniu do tejże pracy. Nawiasem mówiąc doktorantka najpewniej omyłkowo umieściła ją trzykrotnie w Literaturze jako poz. 71, 89 i 136. Natomiast żadna z pozostałych 3 prac (Podgórska et al., *Cells*, 2018; Podgórska et al., *J. Clin. Med.*, 2019; Podgórska et al., *Anticancer Res.*, 2021) nie została umieszczona w Literaturze rozprawy i nie została wspomniana w podpisach tabel (Tabela 13 i 14,) i licznych rysunków (Rys. 19, 23, 24, 28, 30-33, 35, 36, 42, 44 - 48) znajdujących się w części Wyniki rozprawy doktorskiej,
4. nie przekonuje mnie sposób przedstawienia wyników pokazanych na Rys. 37, a szczególnie w jego części A i B, choć i części C i D dalekie są od doskonałości. W najlepszym przypadku można uznać, że został dokonany niewłaściwy dobór blotów do reprezentujących je na rysunku histogramów densytometrycznych. W żaden bowiem sposób nie można zgodzić się z wartościami pokazanymi w części 37B odnoszącymi się do stosunku pAKT/AKT patrząc na blot w części 37A,
5. w oparciu o informacje podane na str. 92 oraz Rys. 38 (Wyniki) należy wnosić, że zastosowane stężenie antagonisty receptora APJ jest wystarczające, aby zablokować go nie dopuszczając do oddziaływania z zarówno endogenną, jak i dodawaną do pożywki apeliną. Przeprowadzono również, jak wynika z opisu, badania celem ustalenia przy jakim stężeniu antagonisty występuje skuteczne wysycenie APJ. Jednocześnie na str. 73 przedstawiono wyniki oznaczania apeliny wewnątrzkomórkowej i wydzielanej do pożywki, z których wynika, że jest ono znacznie niższe niż dodawane do pożywki w celu badania wpływu apeliny na zachowanie badanych komórek. Czy próbowano określić poziom antagonisty APJ, ML221 niezbędny do hamowania działania endogennej apeliny? Stężenie 100 nM nie jest niskie jak chodzi o określenie działania antagonisty. Czy można powiedzieć, że jest ono swoiste i nie zachodzą w wyniku jego zastosowania inne oddziaływania mogące mieć wpływ na zachowanie badanych komórek?

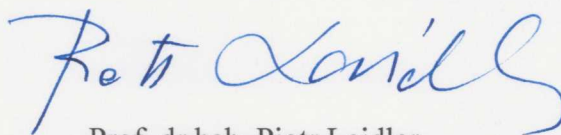
6. zastanawiającym jest przesunięcie czasowe w ekspresji HIF1 α , i genu *APLN* oraz produkcji endogennej apeliny A-36. Najwyższe z udokumentowanych stężenie pierwszego z nich występuje po 36 godz., podczas gdy szczyt ekspresji *APLN* i syntetyzowanej A-36 po 12 godz., wówczas gdy poziom HIF1 α nie jest wysoki (Rys. 49, str. 105 i Rys. 50, str. 106). Jak można to wytłumaczyć? Jakie warunki hipoksji zastosowano? Nawiasem mówiąc szkoda, że – jak wnioskuje na podstawie dokumentacji odnoszącej się do wpływu hipoksji na najogólniej mówiąc zachowanie komórek raka jelita grubego – nie zbadano choćby na poziomie mRNA ekspresji receptora apeliny (*APLNR*) w komórkach hodowanych w warunkach hipoksji, a także nie sprawdzono możliwości hamowania udziału i wymiaru ewentualnej ingerencji apeliny w proces migracji stosując antagonistę *APLNR*, ML221. Z pewnością wnioski wyciągane z eksperymentów prowadzonych w niedotlenieniu odnośnie roli apeliny w migracji byłyby wówczas pewniejsze i bardziej uprawnione,
7. mam świadomość, że niełatwo było zaaranżować prezentowanie złożonych rysunków tak, aby znalazły się na jednej stronie wraz z podpisem i nie czynie doktorantce zarzutu, w związku z faktem, że znacząca ich część zajmuje dwie strony, ale stwierdzam jedynie, że nie jest to forma prezentacji ułatwiająca zapoznawanie się z analizowanym materiałem,
8. doktorantka w skądinąd dobrze i klarownie napisanej Dyskusji omawia wyniki pisząc o podejmowanych decyzjach i prowadzonych badaniach w pierwszej osobie. Absolutnie nie kwestionuję Jej zasadniczego wkładu w realizację pracy zarówno na etapie koncepcyjnym, jak i wykonawczym, ale sądzę, że fortunniejszą formą byłby tryb bezosobowy.

Wniosek końcowy

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że – pomimo wysuniętych w recenzji uwag krytycznych i komentarzy – dysertacja doktorska mgr Marty Podgórskiej pt. „Wpływ apeliny na rozwój raka jelita grubego” prezentuje wyniki oryginalnych, nierzadko znajdujących się jeszcze na wstępnym etapie badań przeprowadzonych z wykorzystaniem aktualnie stosowanych i powszechnie akceptowanych metod badawczych biologii komórki i molekularnej oraz biotechnologii wspartych niezbędnymi biochemicznymi technikami analitycznymi. Przedstawione i przedyskutowane wyniki, jak rozumiem na podstawie posiadanej dokumentacji częściowo już opublikowane, stanowią oryginalny i trwały wkład

do nauki i otwierają dalsze interesujące obszary badawcze, co stanowi o ich niezaprzeczalnej wartości. Praca doktorska mgr Marty Podgórskiej stanowi spójne, dojrzałe opracowane dzieło, które prezentuje oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i wykazuje, że doktorantka posiada zadowalającą wiedzę w dyscyplinie naukowej będącej przedmiotem Jej zainteresowania, a także umiejętność planowania i prowadzenia badań oraz interpretowania i komentowania ich wyników w świetle dostępnej aktualnie literatury. Stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia wszelkie wymogi zwyczajowe, stawiane pracom doktorskim, jak również warunki określone w ustawie Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r, Dz.U z 2018 r., poz. 1668 z późniejszymi zmianami).

W mojej ocenie przedłożona praca w pełni kwalifikuje doktorantkę do dalszych etapów przewodu doktorskiego, o co niniejszym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego.



Prof. dr hab. Piotr Laidler