

Katedra Biochemii i Immunochemii

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Marty Podgórskiej pt. „*Wpływ apeliny na rozwój raka jelita grubego*” wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Doroty Nowak, prof. Uniwersytetu Wrocławskiego

Przedstawiona mi do recenzji praca jest próbą określenia roli jednej z adipokin – apeliny – w patogenezie raka jelita grubego. Temat podjęty przez Doktorantkę jest bardzo aktualny i społecznie istotny ze względu na częstość występowania tego typu nowotworu i - w przypadku nowotworów o znacznym stopniu zaawansowania - ograniczenie opcji terapeutycznych do chemio- i/lub radioterapii, cechujących się niezadawalającymi efektami przy dużej toksyczności. Tym samym, prace prowadzone przez mgr Martę Podgórską wpisują się w, intensywnie eksplorowany, nurt badawczy związany z poszukiwaniem nowych celów dla terapii molekularnie ukierunkowanych, będących jednym z filarów medycyny spersonalizowanej. W tym kontekście za mocną stroną pracy uważam połączenie badań eksperymentalnych (*in vitro*), pozwalających określić pronowotworową aktywność biologiczną apeliny i jej receptora, z badaniami obserwacyjnymi, potwierdzającymi wartość systemu apelinowego dla terapii nakierowanej na cele molekularne.

Recenzowana praca liczy 143 strony maszynopisu, 243 pozycje piśmiennictwa i ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Pracę otwiera spis treści i wykaz stosowanych skrótów oraz streszczenia w j. polskim i angielskim.

W obszernym *Wstępie*, Doktorantka omawia etiologię raka jelita grubego i zagadnienia nowotworzenia ze szczególnym uwzględnieniem związku z otyłością oraz charakteryzuje adipokiny, w tym apelinę i jej receptor w fizjologii i patologii. Za bardzo cenne uważam umieszczenie licznych rycin poglądowych ułatwiających zrozumienie omawianych treści. Niestety, dobór zagadnień w tej części pracy i ich proporcje budzą moje zastrzeżenia. Interesujące jest przedstawienie cech charakteryzujących komórkę nowotworową i własności ułatwiających transformację nowotworową, ale tym ogólnym informacjom towarzyszyć powinien pełniejszy opis mechanizmów związanych z transformacją nowotworową w jelicie grubym – temacie dysertacji. Mam tu na myśli klasyczną ścieżkę adenoma-adenokarcynoma i alternatywną ścieżkę polipów ząbkowanych oraz przez mechanizm wiodący przez chroniczny stan zapalny i stres oksydacyjny, towarzyszące nieswoistym zapaleniom jelit. Z uwagi na fakt, że tematem rozprawy jest wyłącznie system apelina/APJ, bez najmniejszych odniesień do ekspresji czy stężenia innych adipokin, nie znajduje uzasadnienia poświęcenie całego podrozdziału leptynie, adiponektynie, czy rezystynie. Nie bardzo też rozumiem klucz wyboru zagadnień do podrozdziałów dedykowanych apelinie w fizjologii i patologii. Doktorantka poświęca sporo miejsca chorobom sercowo-naczyniowym i cukrzycy, co, w połączeniu z otyłością, uzasadnione byłoby w pracy dedykowanej chorobom kardiometabolicznym. W rozprawie poświęconej rakowi jelita grubego zasadne jest omówienie roli adipokiny w jelicie grubym lub szerzej, w przewodzie pokarmowym, a tego zabrakło. Szczególnie

brakuje odniesień do związku apeliny z nieswoistymi zapaleniami jelit, mimo istniejących doniesień literaturowych w tym temacie. Dlaczego omawiając rolę apeliny w angiogenezie, Doktorantka opiera się na badaniach dotyczących udaru czy retinopatii cukrzycowej, a nie wspomina nic o angiogenezie nowotworowej, mimo że istnieją doniesienia jej dotyczące w CRC (Kidoya i wsp. 2011) oraz innych nowotworach (np.: Frisch i wsp, 2020 – glejak, Uribealga i wsp. 2019 – rak płuc i gruczołu sutkowego, Muto i wsp. 2014 – rak wątroby)? Niestety w tej części pracy pojawia się też sporo nieścisłości i niedopowiedzeń, np.:

- (1) rola stanu zapalnego nie ogranicza się do wspierania angiogenezy nowotworowej, co ważniejsze w przypadku jelit, jest czynnikiem inicjującym transformację nowotworową (str. 15);
- (2) czynniki proangiogenne są wydzielane nie tylko przez komórki nowotworowe, ale też komórki z otoczenia guza (str.15);
- (3) proliferujące komórki jelit nie muszą tworzyć gruczolaka by powstał guz nowotworowy – *vide* ścieżka wiodąca przez stan zapalny/stres oksydacyjny u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit (str. 16);
- (4) upośledzone wydzielanie insuliny jest charakterystyczne dla cukrzycy typu 1, dla cukrzycy typu 2 jest to insulinooporność, której w okresie kompensacji przejściowo towarzyszy hiperinsulinizm, a upośledzenie wydzielania hormonu pojawia się dopiero w zaawansowanej i niewyrównanej cukrzycy (str.16 i 17);
- (5) ani witaminy, ani magnez nie są mikroelementami (str.20);
- (6) leptyna jest również adipokiną zwiększającą insulinowrażliwość komórek, jednak w otyłości efektu tego nie widać z uwagi na współistniejącą leptynooporność (str.22);
- (7) kolokalizacja cząsteczek nie jest jednoznaczna z identycznością pełnionych funkcji (str.26);
- (8) metabolizm to całokształt przemian biochemicznych, nie jeden proces (str.26);
- (9) hipertrofia to przerost, nie jest więc synonimem przerostu (konkretnie) mięśnia sercowego (str.27);
- (10) przywrócenie krążenia po niedokrwieniu nie jest przyczyną hipoksji (str.29);
- (11) wielokrotnie Doktorantka odnosi się do jelita lub nowotworu (l.poj.), nie precyzując o które jelito czy typ nowotworu chodzi;
- (12) z rozwojem nowotworów wiąże się angiogeneza nowotworowa a nie „długotrwała angiogeneza” (str.32);
- (13) model myszy udaru niedokrwinnego, ponieważ model, nawet mysz, nie może mieć udaru (str.32);
- (14) eksperymenty nie badają, nawet młodych mężczyzn (str.33);
- (15) akumulacja adipocytów (wzrost liczebności) towarzyszy rozrostowi hiperplastycznemu tkanki tłuszczowej, natomiast z otyłością wiąże się raczej rozrost hipertroficzny (wzrost rozmiaru adipocytów) (str.33);
- (16) retinopatia, nefropatia, czy kardiomiopatia cukrzycowa to powikłania cukrzycy, zarówno typu 1, jak i 2 (str.35 i 36);
- (17) proliferują komórki nowotworowe, a nie „szereg nowotworów” (str.36);
- (18) „nowotworzenie”, w którym przegląd udziału apeliny zapowiada Tabela 4, to wieloetapowy proces obejmujący transformację nowotworową, rozrost guza, angiogenezę, przerzutowanie, etc., tymczasem w Tabeli 4 umieszczono zestawienie stężenia/poziomów apeliny w różnych typach nowotworów;
- (19) „czynników stymulujących przejście równowagi angiogennej w stronę angiogenezy” (str.38) powinno być zastąpione przez „czynników stymulujących angiogenezę”;
- (20) czynniki angiogenne są wydzielane przez komórki nowotworowe lub uwalniane z (str.38);
- (21) nie jest jasne, co Doktorantka rozumie pod pojęciem „zaburzeń w sieci naczyń krwionośnych” – prosiłabym o wyjaśnienie (str.38);
- (22) „skutkujący proliferacją i migracją komórek nabłonkowych wewnątrz tkanki nowotworowej i tworzeniem naczyń krwionośnych” o czynnikach angiogennych (str.38) – powinno być raczej komórki śródbłonna, bo komórki nabłonkowe w przypadku CRC (nowotwór wywodzący się z nabłonka), to komórki rakowe;
- (23) sama eNOS nie stanowi ścieżki sygnałnej (str.38 i 39), podobnie jak MMP, IL, VEGFA i ANG1 (str.39), to raczej geny efektorowe, których ekspresja jest modulowana w wyniku aktywacji szlaku;
- (24) ostatnie zdanie pierwszego akapitu na str.39 nie ma sensu.

Błędy stylistyczne, szczególnie takie, które powodują trudności z określeniem, co jest podmiotem zdania, utrudniają śledzenie toku rozumowania Autorki. Przykładowo, Doktorantka nadużywa zaimków wskazujących – określenie „te wyniki” mogą się odnosić do wyników omawianych w poprzednim zdaniu (z cytowaniami [160] i [161]) lub do wyników (nieomówionych) z cytowań [162, 163], umieszczonych na końcu zdania (str.34). Zdanie rozpoczynające się stwierdzeniem „jest to stan patologiczny”, może odnosić się i do hipoksji, i do zespołu poreperfuzyjnego, wymienionych w zdaniu poprzednim (str.29). Podmiot „system apelinowy” w kolejnym zdaniu zamienia się w „podanie tego peptydu” (str.29).

Niestety dostrzegam też różnorodne nieprawidłowości w cytowaniu literatury:

- (1) Autorka umieszcza pojedyncze odnośniki literaturowe do prac oryginalnych, zapowiadanych w tekście jako „wiele wyników sugeruje” (str.29), „prace badające” (str.29), „w szeregu badań wykazano (str.33);
- (2) niewłaściwe cytowania, np.: apelina ma być sugerowana jako biomarker hipertrofii lewej komory serca z odniesieniem do pracy przeglądowej dotyczącej apeliny jako potencjalnego celu terapeutycznego ([112]), w której słowo „biomarker” nawet nie pada (str.28); apelina jako „biomarker chorób układu sercowo-naczyniowego” z odesłaniem do pracy dotyczącej wpływu leczenia związkami poprawiającymi insulinowrażliwość na apelinę ([110]); podwyższone stężenie apeliny-12 jako czynnik zwiększający podatność na cukrzycę z odniesieniem do pracy [161] dotyczącej związku między występowaniem konkretnego polimorfizmu w genie *APLN* a częstością występowania cukrzycy (str.34);
- (3) cytowania „z drugiej ręki”, np.: praca Gonzales’a i wsp. 2006 [36] (str.20) cytowana jest w kontekście związku między konsumpcją czerwonego mięsa a CRC, mimo, że dotyczy gruczolaka przełyku i wpustu żołądka, a związek z CRC to cytata starszej pracy Novat’a i wsp. 2002, przytoczonej przez autorów w dyskusji;
- (4) błędne tłumaczenie treści oryginalnej, np.: „colorectal cancer” przetłumaczony jako rak jelita i odbytu (str.20), a jest to rak jelita grubego (a nie np. cienkiego), którego ostatnim odcinkiem jest odbytnica (rectum) - błąd tym poważniejszy, że nowotwory odbytu (anus) to w znakomitej większości raki płaskonabłonkowe, a odbytnicy – gruczolaki i tym bardziej zawstydzający, że dotyczy nowotworu będącego przedmiotem dysertacji;
- (5) brak odnośników we fragmentach wymagających wskazania źródła, np.: „Istnieje także połączenie pomiędzy cukrzycą a nowotworzeniem” (str.35).

W dalszej części pracy Doktorantka definiuje cel badań – jest on jasny – ustalenie, czy apelina wpływa na rozwój raka jelita grubego. Ale kolejność podzadań wymienianych w dalszej części tego działu nie jest optymalna. To część *in vitro* zdecydowanie stanowi trzon pracy i jest głównym środkiem umożliwiającym realizację postawionego celu, więc powinna być wymieniona jako pierwsza. Natomiast badania obserwacyjne na pacjentach są jedynie cennym uzupełnieniem, dokumentującym istnienie zaburzeń systemu apelina/APJ u pacjentów, a zatem potwierdzającym potencjał szlaku jako celu terapii antynowotworowej. I na szczęście, ponieważ kolejne części pracy – *Materiały i odczynniki* i *Wyniki* – nie budzą większych zastrzeżeń w części eksperymentalnej, a wręcz charakteryzuje je dobre planowanie, rozmach w wykonaniu i bogactwo warsztatu badawczego, natomiast część „kliniczna” pozostawia duży niedosyt. W podrozdziale *Charakterystyka pacjentów* zabrakło informacji o typie histologicznym nowotworu; użytym kryterium klasyfikacji sublokalizacji guza (definicja lewego i prawego jelita); metodach diagnostycznych wykorzystanych do określenia stopnia zaawansowania choroby; czy precyzyjnych kryteriach włączenia i wyłączenia pacjentów do/z badań. Szczególnie ważne, w kontekście tak szeroko omawianych przez Doktorantkę związków apeliny z chorobami kardiometabolicznymi, byłoby podanie i przeanalizowanie chorób współistniejących. Z tego też względu niepokojący jest brak informacji, czy grupa badana i kontrolna były zrównoważone pod tym względem. Ogólna klasyfikacja zaawansowania choroby w systemie TNM, tzw. „stage”, to wypadkowa jej elementów: głębokości naciekania (T) i przerzutowania do węzłów chłonnych (N) i odległych narządów (M), mylące są więc opisy danych patologicznych sugerujące niezależność „stage’u” od wartości T, N i M, pojawiające się w tej części

pracy oraz w *Wynikach*. Dalszy opis odczynników i materiałów oraz metod jest klarowny i wyczerpujący, m.in. dzięki ilustracjom poglądowym i licznym zestawieniom w formie tabel. Uwagę zwracają niewielkie drobiazgi: w Tab. 5 dwukrotnie umieszczono III stopień zaawansowania i zwrócić należy uwagę, że zawiera ona nie tylko dane kliniczne i patologiczne (nagłówki tabeli), ale też demograficzne; w części dotyczącej linii komórkowych fragment informujący o wyselekcjonowaniu linii w IITD PAN należałoby przedstawić oddzielnie, ponieważ aktualny zapis może sugerować, że linie tworzą przerzuty do węzłów chłonnych i wątroby w IITD PAN; w Tab.7 zabrakło jednego numeru katalogowego; odczynnik/metoda Bradforda; miejscami brakowało mi informacji o ilości wysiewanych komórek; współczynnik migracji jest raczej wyznaczany niż oznaczany. Ponieważ wybór genu/genów referencyjnych jest kluczowy dla interpretacji wyników qPCR, proszę o informację na jakiej podstawie wybrano *GAPDH* jako normalizator, skoro istnieje wiele doniesień o wpływie procesu nowotworowego na jego ekspresję.

Ogólne spostrzeżenie dotyczące sekcji *Wyniki*, bez względu na to, czy przedstawiane są wyniki części obserwacyjnej, czy eksperymentalnej, dotyczą niepotrzebnego umieszczania rozbudowanych wstępów z cytowaniem literatury, które albo stanowią powtórzenie informacji ze *Wstępu/Materiałów i odczynników* albo powinny się znaleźć w *Dyskusji* (i niejednokrotnie są tam powtórzone); niewyczerpującego przedstawienia zastosowanych skrótów/symboli w tabelach i na rysunkach, biorąc pod uwagę założenie, że powinny one być jasne bez konieczności odwoływania się do tekstu; nadużywania określenia „poziom”, nawet gdy znacznie odpowiedniejsze byłoby „stężenie”. Są to uwagi drobne, poważniejsze zastrzeżenie dotyczy analizy statystycznej, która jest konfundująca. W szczególności moje wątpliwości budzi zastosowanie parametrycznego testu ANCOVA w analizie łącznej grupy kontrolnej i badanej, gdy prawdopodobieństwo braku homogenności wariancji i/lub rozkładu normalnego (założenie testów parametrycznych) jest większe niż w analizie ograniczonej wyłącznie do pacjentów z CRC, w której wykorzystywano testy nieparametryczne. Proszę o wyjaśnienie tej wątpliwości w czasie obrony. Inne uwagi: nie ma potrzeby (jest to wręcz mylące) podawania jednocześnie średniej arytmetycznej i mediany; do mediany tradycyjnie podaje się zakres kwartałowy jako miarę rozrzutu a nie zakres, choć polecaną miarą rozrzutu – i dla średniej, i dla mediany – jest 95% przedział ufności, co ułatwia analizę porównawczą danych z i bez rozkładu normalnego. Nie tylko nie ma potrzeby, ale wręcz źle wygląda, „tłumaczenie” podstawowych testów statystycznych i ich wyników, np.: wyjaśnienie, że korelacja pozytywna to taka, która „co więcej” sugeruje zależność wprost proporcjonalną między parametrami (str.66), czy obszerny opis zastosowania testu ANCOVA (str.67).

Zabrakło w części klinicznej porównania poziomu ekspresji białka i mRNA w tkance jelita dla receptora i apelinu, oceny korelacji między ich stężeniem w surowicy a ekspresją w jelicie, oceny zależności stężenia receptora w surowicy od zaawansowania choroby, oceny zależności poziomu ekspresji apelinu i jej receptora w tkance na poziomie mRNA i białka od stopnia zaawansowania, oceny zależności badanych parametrów od sublokalizacji guza – jest to o tyle ciekawe, że nowotwory zlokalizowane w lewej i prawej części jelita różni wzorzec molekularny – lokalny, a nawet systemowy – co może tłumaczyć większą agresywność i gorsze rokowania związane z lokalizacją w jelicie prawym. Rozbudowanie wyników części klinicznej wzbogaciłoby pracę i pozwoliło na ciekawszą i bardziej wyczerpującą dyskusję.

Inne drobne uwagi do tej części, to brak opisu osi X na Rys. 19; brak zaznaczenia w tekście lub na rycinie (Rys. 23) wyników analizy post-hoc, oraz wątpliwość czy opis osi Y na Rys.28 jest prawidłowy: dane mają przedstawiać % kontroli, ale skala 0-8, w połączeniu z konkluzją o stymulacji proliferacji przez peptydy apelinowe bardziej odpowiadałaby krotności.

Jak wspomniano wcześniej, część eksperymentalną cechuje rozmach i na szczególną pochwałę zasługuje podsumowanie wyników *in vitro* w zakresie efektów stymulacji komórek rakowych peptydami apelinowymi w formie tabel (Tab.15 i 16) oraz dołączenie do pracy filmów dokumentujących tworzenie wypustek migracyjnych, co uważam za fantastyczny pomysł.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała sześć wniosków, z których jeden zilustrowała – znowu cenna inicjatywa – grafiką. Wnioski są zasadniczo sformułowane poprawnie, odpowiadają celowi pracy, a zastrzeżenia mam dwa. Pierwsze dotyczy zagadnienia na ile prawidłowa jest „tkanka prawidłowa”. W pracy wykorzystano jako punkt odniesienia tkankę z okolic marginesu resekcji. Nawet jeśli potwierdzono histopatologicznie, że margines resekcji jest histopatologicznie wolny od zmian nowotworowych (R0, a takiej informacji zabrakło w *Charakterystyce pacjentów*), to istnieje szereg doniesień dokumentujących zmiany na poziomie molekularnym w okolicy guza, tzw. „margines molekularny”. Poprzedzają one zmiany morfologiczne obserwowane w badaniu histopatologicznym i są obarczane winą za niepowodzenia leczenia chirurgicznego (wznowa) lub powstawanie guzów synchronicznych. W związku z tym, wyniki należy interpretować bardzo ostrożnie, bo bez tkanki jelita pobranej od osoby zdrowej/względnie zdrowej, nie ma pewności na ile ekspresja w otoczeniu guza przypomina ekspresję fizjologiczną badanego czynnika. Rozsądne jest też dostosowanie nomenklatury i unikanie sformułowania „tkanka prawidłowa”. Drugie zastrzeżenie dotyczy ostatniego wniosku, którego część odnosząca się do potencjału diagnostycznego apelinu i jej receptora jest zupełnie nieuzasadniona. Zarówno w tym miejscu na podstawie wyników własnych, jak i w innych częściach pracy (Wstęp, Dyskusja), również interpretując wyniki innych autorów, Doktorantka nadużywa określenia biomarker, bazując wyłącznie na statystycznie znamiennej różnicy stężenia/poziomu między badanymi grupami, która może, ale nie musi przełożyć się (i najczęściej się nie przekłada) na znaczącą moc dyskryminacyjną. Moc diagnostyczna musi być oceniona za pomocą odpowiednich testów statystycznych (analiza ROC) na populacji testowej, a następnie zweryfikowana (zwalidowana) na kohorcie walidacyjnej. Kolejnym ważnym elementem w przypadku potencjalnych biomarkerów typu apelina jest sensowność z punktu widzenia klinicznego – apelina jako marker zastępujący patologiczne określanie stopnia zaawansowania nowotworu (konkluzja Doktorantki) takiego sensu nie ma.

W *Dyskusji* zabrakło prawdziwego dyskursu, jest dużo powtórzeń z poprzednich części pracy, a mimo to rozdział jest objętościowo niewielki (10 stron). A szkoda, bo niektóre wyniki Doktorantki odbiegają od oczekiwanych (np.: brak zależności stężenia apelinu od BMI) i/lub są sprzeczne z danymi literaturowymi (zależność od BMI i stopnia zaawansowania), co należałoby spróbować wytłumaczyć.

W redakcji pracy Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów interpunkcyjnych i edytorskich, m.in. nie do końca prawidłowo operując skrótami, nie zachowując konsekwencji w nazewnictwie (metaloproteazy/metaloproteiny), przedstawiając niekonsekwentnie tytuły cytowanych publikacji (każdy wyraz z dużej/jak w zdaniu), nie wyróżniając prawidłowo dużą literą nazwisk arabskich, czy nazw organizacji.

W podsumowaniu recenzji chciałabym podkreślić, że mimo objętościowo rozległych zastrzeżeń i uwag, uważam dysertację mgr Marty Podgórskiej za oryginalną, aktualną, a w części eksperymentalnej dobrze i z rozmachem zaplanowaną i wykonaną, zaś jej wyniki za istotne z punktu widzenia społecznego i wzbogacające istniejący stan wiedzy, a więc szczególnie warte popularyzacji. Z powyższą opinią zgodzili się zresztą recenzenci czasopism zagranicznych, w których Doktorantka opublikowała już wyniki cząstkowe, zyskując imponujący sumaryczny współczynnik wpływu.

Dlatego też uważam, że rozprawa doktorska mgr Marty Podgórskiej p.t.: „*Wpływ apeliny na rozwój raka jelita grubego*”, spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Dlatego wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr Marty Podgórskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 04.04.2021

Z poważaniem

Małgorzata Krystel-Kozłowska