

Recenzja rozprawy doktorskiej**Mgr inż. Paulina Lewandowska-Poleć****„Wybrane chemokiny z rodziny białek MCP i MIP w raku jelita grubego”****Promotor: Prof. dr hab. Małgorzata Krzystek-Korpacka**

Katedra i Zakład Biochemii

Wydział Nauk Medycznych w
Zabrze11-808 Zabrze ul. Jordana 19
www.sum.edu.pldr hab. n. med. Ewa Romuk,
prof. SUM tel.: (608444688)
eromuk@sum.edu.pl

SEKRETARIAT

tel.: (+48 32) 272 23 18
fax: (+48 32) 272 23 18

biochemz@sum.edu.pl

Rak jelita grubego (RJG) należy do najczęstszych nowotworów złośliwych na świecie. Szeroko zakrojona profilaktyka, dzięki dostępności nieinwazyjnych testów przesiewowych, nie przekłada się znacząco na postęp we wczesnym wykrywaniu RJG. Wynika to w głównej mierze z olbrzymiej heterogenności RJG z jednej strony oraz brakiem opcji terapeutycznych i markerów dla raka przerzutującego z drugiej strony. Problemem jest również olbrzymia grupa pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit, w których sztandarowym objawem są krwiste biegunki, które wielokrotnie zwiększają ryzyko zachorowania na RJG. Heterogenność RJG jest przyczyną niepowodzeń terapii ukierunkowanych na mechanizmy molekularne i utrudnia opracowanie skutecznych molekularnych biomarkerów. Rosnące możliwości diagnostyki molekularnej oraz rozwój nowoczesnych narzędzi molekularnych skłonił Doktorantkę do przybliżenia wzorców ekspresji i wydzielania chemokin z rodziny białek MCP i MIP oraz ich receptorów, jako potencjalnych celów molekularnych i biomarkerów ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjalnego udziału w zdarzeniach okołoperacyjnych. Zmiany molekularne poprzedzające zmiany histopatologiczne i morfologiczne, oprócz tkanki zmienionej nowotworowo, mogą pojawiać się również w tkance otaczającej guz, długo uznawanej za bierną. Zarówno rozwojowi nowotworu jak i zabiegowi operacyjnemu towarzyszą zaburzenia odpowiedzi zapalnej i immunologicznej. Chirurgia z wykorzystaniem robotów daje nowe możliwości ale stanowi duże wyzwanie dla badaczy celem zgłębienia, stosunkowo słabo poznanych, towarzyszących zabiegom zmianom mechanizmów molekularnych.

Charakterystyka ogólna pracy

Rozprawa liczy 126 stron i składa się wykazu skrótów, oraz następujących rozdziałów: wstępu, celów pracy, materiałów i metodyki badań, wyników, dyskusji, wniosków, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazu rycin (8), tabel (11) i wykresów (40), piśmiennictwa (175 pozycji) Na końcu są

dołączone zgody Komisji Bioetycznej oraz spis publikacji własnych Praca jest przejrzysta i starannie sformatowana.

Wstęp

Doktorantka wnikliwie i szczegółowo wprowadza czytelnika w podjęty temat badawczy. Charakteryzuje zapalne i nowotworowe choroby jelit – nieswoiste zapalenie jelit, rak jelita grubego. W kolejnych podrozdziałach przybliży rolę stanu zapalnego i chemokin w nowotworzeniu i przerzutach odległych. W procesie przerzutowania, zwraca uwagę na to, że komórki nowotworowe mogą wydzielać lub indukować wydzielanie chemokin oraz ekspresjonować ich receptory, co umożliwi migrację komórek nowotworowych i tworzenie wtórnych ognisk nowotworowych poza guzem pierwotnym. Następnie Doktorantka charakteryzuje chemokiny z rodziny białek zapalnych makrofagów (MIP) i białek chemotaktycznych dla monocytów (MCP) oraz atypowe receptory chemokin. W ostatnim podrozdziale charakteryzuje oksykamy, należące do niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). NLPZ uważane są za najbardziej obiecujące chemoterapeutyki w prewencji RJG, dlatego Doktorantka dogłębnie analizuje i przedstawia ich przeciwnowotworowy mechanizm działania.

Rozdział ten stanowi bardzo ciekawe i wyczerpujące opracowanie, które może być wykorzystane do napisania pracy poglądowej. Doktorantka wnikliwie i dogłębnie analizuje rozległy i złożony temat roli chemokin w raku jelita grubego.

Cel pracy

Celem nadrzędnym pracy była ocena związku między wybranymi chemokinami dla monocytów/makrofagów z rodziny MIP i MCP a rakiem jelita grubego. Realizacja założonego celu była oparta o szereg celów pośrednich. Doktorantka oceniała - ekspresję chemokin MCP (*CCL2*, *CCL7* i *CCL8*) oraz MIP (*CCL3*, *CCL4*, *CCL19* i *CXCL2*) w guzach nowotworowych, ich otoczeniu i tkance prawidłowej; zależność wzorców ekspresji chemokin MCP (*CCL2*, *CCL7* i *CCL8*) oraz MIP (*CCL3*, *CCL4*, *CCL19* i *CXCL2*) od cech kliniczno-patologicznych RJG; wzorce ekspresji klasycznych (*CCR2*) i atypowych receptorów chemokin (*ACKR2* i *ACKR4*) w guzach nowotworowych, ich otoczeniu i tkance prawidłowej; wzorce ekspresji klasycznych (*CCR2*) i atypowych receptorów chemokin (*ACKR2* i *ACKR4*) w zależności od cech kliniczno-patologicznych RJG; stężenia prototypowych chemokin MCP-1 oraz MIP1 α i β we krwi pacjentów z RJG w porównaniu do osób zdrowych; potencjalny związek z cechami kliniczno-patologicznymi RJG; dynamikę zmian stężenia prototypowych chemokin MCP-1 oraz MIP-1 α i β w okresie okołoperacyjnym i jej związku z przebiegiem operacji oraz powikłaniem w postaci zakażenia rany pooperacyjnej; zdolności modulatorowe oksykamów klasycznych (piroksykam, meloksykam) oraz ich pochodnych wobec chemokin w RJG:.

W mojej opinii cel główny jak i cele szczegółowe zostały prawidłowo postawione i sprecyzowane.

Material i Metody

Projekt badawczy realizowany przez Doktorantkę uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej KB/nr 1/2012 przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu oraz zgodę Komisji Bioetycznej KB-247/2018 przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu. Założony cel pracy realizowano wieloetapowo. Ograniczeniem pracy było korzystanie z materiału archiwalnego. Ilość dostępnej matrycy cDNA, nie była wystarczająca na wykonanie kompletu badań u wszystkich pacjentów – stąd różna liczebność grup przy ocenie ekspresji poszczególnych genów.

W badaniu dotyczącym wzorców transkryptomicznych receptorów chemokin przeanalizowano biobankowane sparowane próbki jelit 51 pacjentów z gruczolakorakiem jelita grubego. Badaniem dotyczącym wzorca krążących chemokin w odniesieniu do sublokalizacji guza objęto 104 pacjentów przyjętych celem leczniczej resekcji RJG, którzy nie byli uprzednio poddani chemio- lub radioterapii. Do badania dotyczącego wzorca krążących chemokin w odniesieniu do typu operacji włączono 61 pacjentów z rakiem jelita grubego poddanych resekcji leczniczej. Materiał badany stanowiła tkanka, krew oraz certyfikowane ludzkie adherentne komórki nabłonkowe gruczolakoraka jelita grubego – linia Caco-2 (ATCC® HTB-37™). Piroksykam i meloksykam uzyskano odpowiednio ze źródeł komercyjnych: Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA) i Alfa Aesar (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) i wykorzystano jako wzorce odniesienia. Nowe analogi oksykamów, oznaczone jako związki #1–5, zostały zsyntezowane przez dr Berenikę Szczeńiak-Sięgę z Katedry Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego, według metod opisanych szczegółowo w publikacjach. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka charakteryzuje zastosowane metody preparatywne, analityczne i narzędzia statystyczne.

Wyniki

Wyniki Doktorantka przedstawiła w 11 tabelach, na 8 rycinach, i 40 wykresach wykorzystując do analizy MedCalc Statistical Software.

Analizując ekspresję chemokin z rodzin MCP i MIP w RJG Doktorantka wykazała pozorne obniżenie ekspresji CCL2, CCL8 i CCL19 przy stałym poziomie ekspresji CCL3 i CCL7, a jedynie niewielkim wzmożeniu ekspresji CCL4 i CXCL2 w guzie w stosunku do tkanki otaczającej, podczas, gdy ekspresja chemokin w guzie była w rzeczywistości wyższa niż w tkance prawidłowej, nieznamienne w przypadku CCL8 i CCL19;

Wraz z nasilaniem się procesu przerzutowego do okolicznych węzłów chłonnych Doktorantka wykazała wzrost stężenia (MCP1) i gradientu ekspresji chemokin (CCL8, CCL2, CCL3) i ich receptora (ACKR4) między guzem a otoczeniem,

Doktorantka wykazała, że stężenie (MCP1) i gradient ekspresji chemokin (CCL8, CCL2, CCL3) i ich receptora (ACKR4) między guzem a otoczeniem narastał wraz z nasilaniem się procesu przerzutowego do okolicznych węzłów chłonnych,

Stężenie chemokin w surowicy (MCP-1) oraz gradient ich atypowych receptorów (ACKR2 i 4) między guzem a otoczeniem rośnie wraz ze wzrostem stopnia złośliwości guza

Doktorantka wykazała, że w operacjach robotowych obserwuje się znamienne mniejszy wyrzut MCP-1 w pierwszych godzinach po wykonaniu nacięcia i rozłożony na pierwszą dobę łagodny wzrost stężenia MIP-1 α i β ,

Doktorantka wykazała, że zmiany stężenia prototypowych chemokin w krążeniu we wczesnym okresie okołoperacyjnym zależały od:

- długości operacji; dłuższym zabiegom towarzyszyło niższe stężenie MIP-1 α i β w trzeciej dobie;
- utraty krwi; większa utrata krwi podczas zabiegu wywoływała gwałtowniejszy wyrzut MCP-1 w pierwszych godzinach od nacięcia i gwałtowniejszy spadek po osiągnięciu maksimum w po 8h zabiegu; podobny schemat prezentowały krążące MIP-1 α i β ;
- transfuzji; konieczność przetoczenia krwi skutkowała brakiem normalizacji stężenia MCP-1 i MIP-1 β w trzeciej dobie, obserwowanej u pacjentów niewymagających transfuzji;

Doktorantka wykazała, że zmiany w stężeniu MCP-1 mogą być przydatne w przewidywaniu zakażeń rany pooperacyjnej z 72% dokładnością; nieszczelności zespolenia z 81% dokładnością; pooperacyjnego paraliżu jelit z 73% dokładnością;

Dokonując oceny zdolności modulatorowych oksykamów klasycznych (piroksykam, meloksykam) oraz ich pochodnych wobec chemokin w RJG Doktorantka wykazała że klasyczne oksykamy (piroksykam i meloksykam) w niewielkim stopniu i głównie nieznamienne wpływały na ekspresję chemokin *CCL2*, *CCL3*, *CCL4* i *CXCL2*, natomiast pochodne oksykamów - w szczególności związki #1-3, opracowane w Katedrze Biochemii Leku przez panią dr Berenikę Szczęśniak-Sięgę - hamowały ekspresję chemokin Jednak przy wysokim stężeniu lub dłuższej ekspozycji zdawały się mieć efekt cytotoksyczny, związany ze znacznym i znamionym wzrostem ekspresji i stężenia *CCL2*/MCP-1 oraz ekspresji *CXCL2*; Obecność łącznika propylenowego między atomami azotu tiazyny i piperazyny oraz jeden podstawnik fluorowy w farmakoforze arylopiperazyny warunkowały najskuteczniejszą i najbardziej spójną w działaniu pochodną.

Dyskusja i wnioski

Zaobserwowane przez Doktorantkę zmienione sygnatury chemokin i ich receptorów u pacjentów z RJG, zarówno w tkankach guza, jak i okolic marginesu resekcji, i makroskopowo i histologicznie prawidłowych, są obserwacją niepokojącą. Fakt ten może tłumaczyć niepowodzenia chirurgiczne w leczeniu RJG i/lub odpowiadać powstawanie guzów synchronicznych. Zmiany ekspresji i sekrecji chemokin i ich receptorów wiązały się szczególnie z przerzutowaniem do węzłów chłonnych oraz z agresywnością RJG. Doktorantka

dowodła, że heterogenność RJG wynikająca z sublokalizacji nie ogranicza się do zmian w profilu genetycznym i epigenetycznym, w szczególności genów związanych z cyklem komórkowym, przeżyciem i wzrostem, ani też do samego guza, ale może dotyczyć mediatorów lokalnej i ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej i immunologicznej (*CCL8*, *CCR2*, *ACKR4*, *MIP-1α* i β) oraz pozornie prawidłowej tkanki otaczającej, co należy uwzględnić projektując molekularnie ukierunkowane terapie i biomarkery, będące filarami medycyny spersonalizowanej.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują, że minimalizacja stresu operacyjnego przez wykorzystanie chirurgii robotowej obejmuje również mniejszy wyrzut i łagodniejsze fluktuacje stężenia badanych chemokin, w szczególności MCP-1.

Zmiany stężenia MCP-1 poprzedzają manifestację kliniczną niekorzystnych zdarzeń, tym samym monitorowanie zmian MCP-1 w tym okresie, indywidualnie lub w zestawie z innymi markerami, może być cenne i wykorzystane do wdrożenia kroków zaradczych jeszcze przed pojawieniem się objawów klinicznych.

Badane przez Doktorantkę pochodne oksykamów okazały się skuteczniejsze niż klasyczne leki referencyjne (piroksykam i meloksykam), i dodatkowo mniej toksyczne wobec żołądka i jelit, co jest szczególnie istotne w kontekście chemoprewencji RJG u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit.

Dyskusja jest napisana poprawnie. Doktorantka odnosi uzyskane w pracy wyniki własne dotyczące własności predykcyjnych badanych chemokin, a w szczególności MCP-1, do prac innych badaczy podkreślając ich duży potencjał kliniczny a jednocześnie mając świadomość złożoności procesów molekularnych regulujących ich wydzielanie. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wzbogacają aktualną wiedzę o zmianach molekularnych w tkance sąsiadującej z guzem w RJG, podkreślając rolę lokalnych i ogólnoustrojowych mediatorów odpowiedzi zapalnej i immunologicznej, szczególnie chemokin, jak i ich receptorów – klasycznych prozapalnych oraz atypowych przeciwzapalnych.

Jednocześnie przedstawiona mi do recenzji praca przyczynia się do lepszego zrozumienia podłoża molekularnego korzystnych efektów klinicznych związanych z zabiegami operacyjnymi wykonywanymi w asyście robota. Potrzebne jest jeszcze dokładniejsze zrozumienie mechanizmów ekspresji i roli chemokin w modulacji odpowiedzi zapalnej i immunologicznej. Szczególnie istotne wydaje się zrozumienie mechanizmów regulacji ich ścieżek sygnałowych oraz mechanizmów genetycznych i epigenetycznych regulujących ekspresję chemokin i ich receptorów. Może to dać szansę na opracowanie nowych leków modulujących odpowiedź immunologiczną w terapii min. chorób nowotworowych.

Wnioski zostały sformułowane prawidłowo i odpowiadają celom pracy.

Piśmiennictwo

Piśmiennictwo obejmuje 175 pozycji, dobranych prawidłowo, obejmujących aktualne pozycje w poruszonym przez Doktorantkę temacie. 53% pozycji literaturowych pochodzi z ostatnich pięciu lat. Rozprawę zamykają streszczenia w języku polskim oraz angielskim, przedstawiające skrótowo założenia pracy oraz uzyskane wyniki.

Warto podkreślić, że dotychczasowy dorobek Doktorantki obejmuje sześć publikacji, w dwóch Doktorantka jest pierwszym autorem.

Łączny IF tych prac wynosi 24,919, MNiSW – 570.

Uwagi:

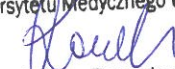
- ograniczenia dostępności materiału badanego zbyt mała ilość dostępnej matrycy cDNA niepozwalająca na wykonanie kompletu oznaczeń u wszystkich pacjentów, przeprowadzenie badań w poszczególnych podprojektach na grupach badanych o różnej liczebności mogły wpłynąć na poziom istotności statystycznej uzyskanych wyników. Zwiększenie liczby analizowanych próbek może spowodować, że istotność statystyczna będzie bardziej widoczna. W celu potwierdzenia uzyskanych przez Doktorantkę wyników oraz ustalenia możliwych mechanizmów potrzebne są dalsze badania przeprowadzane zarówno u pacjentów, jak i w hodowlach komórkowych
- mając na uwadze złożoność pracy i ilość przedstawionych interesujących wyników zasadne wydaje się ich pogrupowanie i przedstawienie w postaci odrębnych publikacji

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja zawiera oryginalną i nowatorską koncepcję naukowo-badawczą. Ponadto świadczy o bardzo dobrym warsztacie Doktorantki, umiejętności wyciągania kluczowych wniosków na podstawie uzyskanych wyników. Wymienione wyżej uwagi w recenzji w żaden sposób nie umniejszają wartości i oryginalności dysertacji i są jedynie wskazówkami do dalszych publikacji.

Przedstawiona praca w pełni odpowiada kryteriom stawianym przed kandydatami do stopnia doktora, spełnia warunki określone w art.13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

W związku z tym mam zaszczyt zwrócić się do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Pauliny Lewandowskiej-Połeć do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

PROFESOR SUM BADAWCZO-DYDAKTYCZNY
Katedry i Zakładu Biochemii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

dr hab. n. med. Ewa Romuk, prof. SUM