Białystok, 08.04.2017 r

Recenzja

Pracy doktorskiej Michała Matysiewicza pt.:

„Rola wybranych peptydów opioidowych i cytokin w raku jelita grubego u człowieka".

W ostatnich kilku dziesiątkach lat obserwuje się w całym świecie stale wzrastającą liczbę zachorowań na raka jelita grubego. Przyczynę tego upatruje się między innymi w zmianie sposobu żywienia, w ciągłym stresie życia codziennego, w niekontrolowanych zanieczyszczeniach atmosfery i wody. Te wszystkie mniej lub bardziej określone czynniki niewątpliwie nie zostaną szybko wyeliminowane ze współczesnego życia w krajach uprzemysłowionych. Stale nie posiadamy pełnej wiedzy na temat inicjacji i promocji nowotworów. Nie jest do dziś poznana rola cytokin czy też związków opioidowych w powstawaniu i rozwoju raka. Dlatego też wszystkie informacje uzyskane we współcześnie prowadzonych badaniach zmierzających do wyjaśnienia przyczyn i powiązań patogenetycznych w nowotworzeniu są szczególnie wartościowe.

Doktorant postawił sobie ambitny cel określenia roli wybranych peptydów opioidowych i cytokin w raku jelita grubego u człowieka. Zaplanował szczegółowe zadania badawcze - określenia stężenia β-endorfiny i wybranych cytokin w surowicy, moczu i tkankach guza pozyskanych od 110 pacjentów z rakiem jelita grubego w porównaniu z grupą kontrolną 60 osób zdrowych. Autor zaplanował także określenie zmian zachodzących w funkcjonowaniu komórek nowotworowych raka jelita grubego: Caco-2, HT-29 oraz komórek prawidłowych nabłonka jelita grubego: CCD 841 CoTr pod wpływem acetylocholiny, norepinefryny oraz β-endorfiny. Badania te zaprogramowane zostały w 3 częściach – 1 - oznaczenie poziomu β-endorfiny oraz wybranych cytokin (IL-6, TNF-α, IL-1β oraz IL-10) w materiale klinicznym pobranym od pacjentów z rakiem jelita grubego; 2 - przeprowadzenie badania nad efektem działania neuroprzekaźników i β-endorfiny na wybrane linie komórkowe jelita grubego *in vitro*. Zbadanie zmian w sekrecji wybranych cytokin, proliferacji komórek (testem BrdU), żywotności komórek (testem wychwytu NR) oraz zmiany w ekspresji genu MOR (μ-receptor opioidowy); 3 - określenie w warunkach *in vitro* efektu działania acetylocholiny, norepinefryny i β-endorfiny na układ immunologiczny PBMC (ang. *peripheral blond mononuclear cells*) pacjentów z rakiem jelita grubego.

Zaprojektowano również podwójny układ kanapkowy *in vitro*, w którym wykazano wpływ neuroprzekaźników i β-endorfiny poprzez komórki układu immunologicznego (PBMC) na proliferację komórek Caco-2, HT-29 i CCD 841 CoTr.

Przedstawiona mi do oceny praca w klasycznej postaci odrębnego, stanowiącego jednolitą całość tomu obejmuje 205 stron maszynopisu z 69-ma rycinami, 30-ma tabelami i trzema fotografiami, zaopatrzona w 257 pozycji piśmiennictwa.

We *Wstępie* Autor nakreślił ogólne dane dotyczące anatomii jelita grubego. Przedstawił także aktualne dane z epidemiologii, etiologii, patomorfologii oraz obrazu klinicznego raka tego narządu z uwzględnieniem obowiązujących klasyfikacji. Następnie przedstawił peptydy opioidowe i ich dotychczas określoną rolę w progresji raka jelita grubego oraz znaczenie cytokin w patogenezie raka jelita grubego z szerszym przedstawieniem roli IL-6, TNF-α, IL-1β, a także ILK-10. Wszystkie te informacje odpowiednio dokładnie wprowadzają czytelnika w problematykę związaną z tytułem pracy.

Cel pracy został ujęty w syntetyczny sposób, nakreśla plan działań ze schematem badań, który Autor ujął w postaci trzech (tablic) plansz dotyczących kolejno pierwszej drugiej i trzeciej części doświadczalnej. W tym miejscu mam z obowiązku recenzenta uwagę krytyczną - tablice nie wszystkie są czytelne i obarczone są pewnymi sformułowaniami wprowadzającymi zamieszanie i niejasności. I tak - w tabeli dotyczącej Pierwszej Części Doświadczalnej Autor używa określenia „zdrowi pacjenci" – moja uwaga - jeżeli zdrowi to czy już pacjenci czyli wg. jednej z definicji określenia „pacjent" - czy otrzymywali opiekę medyczną? Proponowałbym stosowanie określenia „zdrowe osoby", czy „osoby z grupy kontrolnej". Nie jest jednocześnie przejrzysta na tej planszy liczba osób badanych i zdrowych – czy jest 110 pacjentów z rakiem j. grubego? czy tkanka 10 zdrowych to byli ludzie z grupy tych „60 zdrowych pacjentów"? czy to był jeden preparat „spulowany" czy były to badania oddzielne? Prawdopodobnie jest to oczywiste dla badacza i w kolejnych fragmentach dysertacji staje się jasne, ale w zapoznawaniu się z rozdziałem *Schemat badań* jest to zagmatwane dla czytelnika. Wskazane było by „pojaśnienie" tablicy w tekście lub zmiana jej zawartości na bardziej klarowną.

W części pracy pt *Materiały* w punkcie 4.1 *Charakterystyka kliniczna pacjentów* Autor charakteryzuje obie grupy badanych osób – kontrolną oraz chorych ze zdiagnozowanym rakiem jelita grubego. Ponadto Autor używa sformułowania „warstwa posluzówkowa" – otóż

słowa „śluzówka" czy „pośluzówka" *de facto* – nie istnieją, są to określenia żargonowe, chociaż używane dość często. Należałoby użyć określenia „warstwa pod błoną śluzową" lub prościj błona czy warstwa podśluzowa. Przy czym należy podkreślić, że Autor we wstępie pracy na stronie 4 używa prawidłowego określenia „błona śluzowa". Jest to zatem raczej błąd „techniczny". W dalszej części rozdziału *Materiały* doktorant przedstawia ustalone linie komórkowe uzyskane z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych oraz sposób uzyskania komórek jednojądrzastych. Scharakteryzowane są również substancje badane.

W rozdziale *Metodyka* Doktorant w części pierwszej rozdziału szczegółowo opisał preparatykę materiału biologicznego (tkanka nowotworowa, krew, mocz) przeznaczonego do badań zawartości β-endorfiny, a także opisał szczegółowo metodę immunohistochemicznego oznaczania ekspresji β-endorfiny w tkance, a także metodykę oznaczania stężenia IL-6, IL-10, i TNF-α, jak również IL-1β w surowicy, w moczu i w homogenatach tkanek. W części drugiej *Metodyki* opisano sposoby określania wpływu acetylocholiny, norepinefryny i β-endorfiny na funkcjonowanie linii komórkowych Caco-2, HT-29 oraz CCD841 CoTr. W rozdziale tym zwraca uwagę niezwykle precyzyjny opis wszystkich metod, co może świadczyć o zaangażowaniu doświadczeniu Autora w tych procedurach. W części trzeciej *Metodyki* Doktorant z podobną dokładnością opisuje przeprowadzone badania wpływu acetylocholiny, norepinefryny i β-endorfiny na funkcjonowanie jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) u pacjentów z nowotworem jelita grubego. Następnie daje opis sposobu hodowania linii komórkowych (Caco-2, HT-29, CCD 841, CoTr czy też uzyskiwania jednojądrzastych komórek PBMC, a także metodę określania proliferacji komórek Caco-2, HT-29 oraz CCD841 CoTr testem BrdU. W rozdziale tym Doktorant prezentuje też zastosowane metody statystyczne, które wydają się być adekwatne do potrzeb prowadzonych badań.

W rozdziale *Wyniki* opisane są rezultaty dokonanych badań i obserwacji pogrupowane w odpowiadające planowi badań podrozdziały – 1. Określanie wpływu acetylocholiny, norepinefryny i β-endorfiny na funkcjonowanie jednojądrzastych komórek krwi obwodowej u pacjentów z rakiem jelita, 2. Określanie proliferacji komórek Caco-2, HT-29 oraz CCD841 CoTr z wykorzystaniem podwójnego komórkowego modelu kanapkowego *in vitro*.

Autor w obrazowy i przejrzysty sposób prezentuje wyniki własne wykorzystując ryciny, fotografie i tabele. Wyniki uzyskane na podstawie przeprowadzonych badań dostarczają

szereg kolejnych informacji. Dotyczy to wzajemnych powiązań np. poziomu β-endorfiny w tkance nowotworowej w zależności od wielkości guza, stadiów zaawansowania choroby, obecności przerzutów, a także niektórych cytokin w podobnym układzie badań. Dalsza część badań ukazuje wpływ acetylocholiny, norepinefryny, β-endorfiny na funkcje linii komórkowych oraz określa wpływ w/w substancji na funkcjonowanie jednojądrzastych komórek krwi obwodowej. Wszystko to dotyczyło pacjentów z rakiem jelita grubego (110 chorych) w zestawieniu z badaniami u osób zdrowych. Jest to wielowątkowe studium wzbogacające naszą wiedzę o istocie zmian powodowanych przez raka w jelicie grubym. Mam jedynie zastrzeżenia do sformułowania tytułów podrozdziałów tej części pracy, wymaga to pewnej lingwistycznej, ale nie merytorycznej korekty.

W rozdziale poświęconym *Dyskusji* Doktorant dokonuje przeglądu dostępnych danych literaturowych na temat roli niektórych opioidowych peptydów i cytokin w raku jelita grubego i w racjonalny sposób przedyskutowuje własne wyniki z obserwacjami innych badaczy dotyczących również i innych nowotworów. Doktorant dokonuje przy tym wielu ciekawych porównań i zestawień. Po przeprowadzeniu dyskusji Doktorant wysnuł 6 wniosków :

1. Stwierdzono mniejsze stężenia β-endorfiny w tkance guza, surowicy i moczu pacjentów z rakiem jelita grubego w porównaniu do pacjentów zdrowych.
2. W surowicy i moczu pacjentów z rakiem jelita grubego stwierdzono wzrost stężenia IL-6 w porównaniu do grupy pacjentów zdrowych. Stężenie IL-6 w surowicy i moczu wzrastało proporcjonalnie do stadium zaawansowania raka. Oznaczanie IL-6 w surowicy i moczu można uznać za czynnik prognostyczny w badaniach przesiewowych.
3. Stosowana acetylocholina, norepinefryna i β-endorfina wpływały na wzrost proliferacji i zmianę żywotności komórek nowotworowych: Caco-2 i HT-29. Odmienne efekty stwierdzono w przypadku linii prawidłowych komórek nabłonkowych jelita grubego: CCD 841 CoTr.
4. Acetylocholina, norepinefryna i β-endorfina wpływała na wzrost sekrecji IL-6 przez komórki układu immunologicznego (PBMC) pacjentów z rakiem jelita grubego.
5. Stymulowany układ immunologiczny (PBMC) pacjentów z rakiem jelita grubego neuroprzekaźnikami i peptydem opioidowym w podwójnym komórkowym układzie kanapkowym *in vitro* wywierał wpływ na obniżenie proliferacji komórek nowotworowych:

Caco-2 i HT-29. Nie stwierdzono różnic w proliferacji komórek prawidłowych nabłonka jelita grubego: CCD 841 CoTr.

6. Układ immunologiczny pod wpływem neuroprzekaźników: acetylocholiny i norepinefryny hamował progresję raka jelita grubego u człowieka.

We wniosku 2 dokonałbym jednak zmiany – otóż za czynnik prognostyczny można uznać nie samo oznaczanie IL-6 w surowicy, a raczej wynik tego oznaczania - wzrost poziomu tej cytokiny i obserwacja jego dynamiki w zależności od różnych czynników (np. wielkość guza, obecność przerzutów itp.). We wniosku 3 i 5 wskazane byłoby uszlachetnienie stylistyczne.

Podsumowanie

Całość przedstawionej mi do oceny rozprawy stanowi cenny wkład w wyjaśnienie procesu nowotworowego jelita grubego z punktu widzenia biochemicznych zjawisk zachodzących na etapie nowotworzenia z uwzględnieniem, co jest szczególnie cenne, dynamiki zmian. Autor na podstawie własnych, oryginalnych doświadczeń uwzględniając wymogi współczesnego warsztatu badań związanego z kliniką i stosując nowoczesne metody biochemiczne, znajduje niezwykle ciekawe zależności w zawartości β-endorfiny w tkance guza i niektórych płynach ustrojowych od obecności raka jelita grubego i stadium jego zaawansowania. Dobre ujęcie tematu, perfekcyjne opisy metodyki badań, sprawne prowadzenie dyskursu naukowego i przedyskutowanie wyników własnych z rezultatami innych badaczy, a także umiejętność wyciągnięcia adekwatnych do uzyskanych wyników wniosków stanowi szczególną wartość dysertacji. Na podkreślenie zasługuje skala przeprowadzonych badań, staranna szata graficzna i opracowanie edytorskie. Całość pracy może być przykładem rzetelnej rozprawy naukowej na stopień doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia i spełnia warunki stawiane takim pracom w myśl ustawy z dn. 14 marca 2003 roku (dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zm.) art.13, ust1.

Dlatego to zwracam się uprzejmie z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie magistra **Michała Matysiewicza** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n.med. Wiktor Łaszewicz