

Dr hab. n. biol. Roman Paduch, prof. nadzw.

Lublin, dn. 28.03.2017 r.

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wydział Biologii i Biotechnologii

Zakład Wirusologii i Immunologii

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr Michała Matysiewicza**

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

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Kostyry

W rozprawie doktorskiej mgr Michała Matysiewicza wykonano badania dotyczące przeciwnowotworowej oraz immunomodulacyjnej aktywności β -endorfiny na komórki wywodzące się z ludzkiego raka jelita grubego jak również prawidłowe komórki ludzkiego nabłonka jelitowego. Określono również rolę tego peptydu opioidowego oraz wybranych neuromediatorów (acetylocholina, norepinefryna) na parakrynnne oddziaływania jednojądrzastych komórek krwi obwodowej chorych na raka jelita grubego z komórkami nowotworowymi i prawidłowymi w hodowli *in vitro*. Ponadto, wykonano immunohistochemiczne oznaczenia poziomu β -endorfiny w tkankach prawidłowych i patologicznych, jak również określono poziom tego peptydu w surowicy oraz moczu pochodzących od pacjentów. Hipotezę badawczą, Autor udowadniał wykorzystując metody immunoenzymatyczne (ELISA), immunohistochemiczne, spektrofotometryczne (wychwyty czerwieni obojętnej, BrdU) oraz Real-Time PCR.

Rak jelita grubego jest złośliwym nowotworem będącym przyczyną wysokiej śmiertelności w grupie pacjentów onkologicznych. Mimo wielu badań i stosunkowo wysokiej wiedzy dotyczącej czynników ryzyka, patogenezы i rozpoznania choroby, oceny zaawansowania, rokowań oraz sposobów leczenia tego nowotworu, to wciąż proces kancerogenezy zachodzący w jelicie grubym nie jest w pełni wyjaśniony i opanowany. Obecnie obowiązujące dwie ścieżki rozwoju raka jelita grubego, tj. model klasyczny sekwencji gruczolak-rak oraz szlak alternatywny neoplazji ząbkowanej nie odpowiadają w pełni na pytanie dotyczące wieloukładowych powiązań, które inicjują rozwój tego nowotworu oraz doprowadzających do jego przerzutów. Zaprezentowane w ocenianej pracy modelowe

studium wzajemnych relacji między wybranymi elementami układu immunologicznego, wybranymi neurotransmiterami, a proliferacją komórek nowotworowych i stadium rozwoju raka jelita grubego wydaje się podejściem dość nowoczesnym zarówno z punktu widzenia diagnostycznego jak i czysto naukowego. Wielowątkowość podjętych badań oraz próba oceny stopnia wzajemnych zależności między badanymi parametrami pozwala więc na wnikliwszą niż dotychczas ocenę procesu nowotworzenia związanego z nabłonkiem jelita grubego. Biorąc więc pod uwagę aktualność podjętego zagadnienia oraz jego istotne znaczenie dla rozwoju wiedzy dotyczącej raka jelita grubego uważam wybór tematu rozprawy doktorskiej za w pełni uzasadniony.

Oceniana rozprawa doktorska przygotowana została w standardowym układzie, przyjętym dla opracowań o charakterze doświadczalnym. Jest to 205 stronicowy maszynopis podzielony na 8 głównych rozdziałów, w ramach których Autor wyróżnił prawidłowo zaplanowane podrozdziały. Uzupełnieniem opisu są 3 fotografie, 69 rycin oraz 30 tabel.

Tekst jest napisany poprawnie, niemniej jednak Autor nie uniknął drobnych potknięć stylistycznych oraz literowych. Uwaga ta dotyczy jedynie zakresu językowego tekstu, nie mając wpływu na wysoką ocenę merytoryczną pracy.

Przedłożona do recenzji rozprawa zawiera **streszczenie** w języku polskim i angielskim. Jest to prawidłowo opracowany i usystematyzowany rozdział, pozwalający na szybkie zaznajomienie się ze stawianą hipotezą badawczą oraz sekwencją doświadczeń zmierzających do jej udowodnienia. Ponadto, zwięzły i przekrojowy opis uzyskanych wyników umożliwia ocenę zasadności wyboru testów eksperymentalnych oraz poprawności i umocowania wniosków w przeprowadzonych obserwacjach.

Wstęp rozprawy stanowi syntetyczny opis bieżącej wiedzy związanej z epidemiologią, etiologią, klasyfikacją i patomorfologią ludzkiego raka jelita grubego jak również roli peptydów opioidowych w rozwoju tego nowotworu. Ponadto, Autor zaprezentował podstawowe cytokiny, które biorą ścisły udział w promocji oraz progresji tej choroby. Zaobserwowałem jednak nieścisłość w definicyjnym opisie nazwy „rak” (*carcinoma*). W zasadzie jest to grupa nowotworów złośliwych wywodząca się, jak Autor wspomniał, z nabłonka jednak endo- i ektodermalnego. Z kolei, cecha naciekania i przekraczania mięśniówki jelita grubego jest już jedynie wtórnym wyróżnikiem zmiany typu złośliwego rozrostu tkanek nabłonkowych.

Niemniej jednak przedstawiony opis jest ciekawym wprowadzeniem w zagadnienie choroby nowotworowej jelita grubego, zwłaszcza, że Autor umiejętnie wskazuje na potencjalne punkty wspólne wiążące rozrost nowotworowy z aktywnością układu nerwowego oraz układu

immunologicznego. Zaakcentowana została również rola β -endorfiny oraz cytokin jako czynników łączących wymienione systemy na tle progresji raka jelita grubego. Opis zaprezentowany w tej części rozprawy w przekonującym stopniu potwierdza więc zasadność i trafność postawionej w tytule dysertacji hipotezy badawczej.

Zasadniczy **cel pracy** dotyczący wpływu β -endorfiny na funkcjonowanie komórek raka jelita grubego *in vitro* jest sformułowany poprawnie. Autor wyróżnił również cztery cele szczegółowe prezentujące zaplanowaną sekwencję badań zmierzających do potwierdzenia założonej tezy. Wydaje się jednak, że można byłoby ograniczyć się do ogólnych opisów zaplanowanych zadań badawczych przedstawionych jako cele pomocnicze bez wyszczególniania metodyki i zakresu planowanych eksperymentów.

Bardzo ciekawym i pomocnym elementem w całościowej analizie pracy jest wykonany przez Autora schemat badań, który porządkuje i systematyzuje zakres planowanych eksperymentów. Graficzne zobrazowanie zaprojektowanych analiz jest również dodatkowym czynnikiem, który wskazuje na szeroki profil podjętych w pracy badań i wzajemne złożone zależności między ocenianymi parametrami.

Materiały i metody zostały przedstawione bardzo szczegółowo pozwalając na odtworzenie przeprowadzonych eksperymentów w innych ośrodkach. Zaproponowana metodyka jest adekwatna do postawionych celów oraz wystarczająca do potwierdzenia postawionej hipotezy badawczej. Interesującym i słusznym, w kontekście zaplanowanych eksperymentów, podejściem studyjnym było podzielenie części doświadczalnej na trzy części. Umożliwiło to wykonanie poszczególnych etapów pracy niezależnie co pozwoliło na klarowną interpretację uzyskanych wyników, a następnie scalenie ich w logiczną całość dającą możliwość wyciągnięcia ogólnych wniosków.

Ponadto, interesującym rozwiązaniem zastosowanym przez Autora jest wykonanie badań na materiale pochodzącym od pacjentów, równoległe z eksperymentami wykonywanymi na komórkach w hodowli *in vitro*. Projekt takich badań wskazuje również na świadomość Autora o konieczności wykonywania analiz w hodowlach komórkowych *in vitro*, a następnie uwzględniania ich efektów w ocenie wyników doświadczeń uzyskanych z materiału pobranego od chorych.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały opisane bardzo dokładnie. Ponadto, zostały one przedstawione na czytelnych wykresach ułatwiających lekturę tego rozdziału oraz szczegółową analizę przeprowadzonych badań. Testy statystyczne zostały dobrane prawidłowo, a przeprowadzona analiza nie budzi zastrzeżeń.

Moja uwaga dotyczy jedynie rozbieżności między opisem wyników, a ich zobrazowaniem na rycinie 7B. Stężenie β -endorfiny w moczu pacjentów było, podobnie jak w surowicy, niższe w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych, a nie wyższe jak wskazuje Autor.

Generalnie, rozdział ten jest opracowaniem bardzo obszernym, stąd też na uznanie zasługuje umiejętne i przejrzyste zaprezentowanie wszystkich wyników badań w formie stanowiącej logiczną ciągłość. Wskazuje to również na świetne zorientowanie Doktoranta w zakresie prowadzonych eksperymentów oraz duży wkład pracy, który musiał zostać wykonany w celu uzyskania satysfakcjonujących wyników badań. Z kolei, uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w zrozumienie interakcji wieloukładowych mogących brać udział w rozwoju raka jelita grubego.

Dyskusja, podobnie jak poprzedni rozdział, jest dość obszernym i wieloaspektowym fragmentem recenzowanej rozprawy. Przeprowadzenie przez Autora podziału treści na podrozdziały jest więc ważnym zabiegiem ułatwiającym płynną lekturę tej części pracy. Doktorant umiejętnie interpretuje wyniki własnych badań w oparciu o literaturę światową oraz własne przemyślenia. Biorąc pod uwagę złożoność podjętej problematyki badawczej oraz konieczność jej analizy w oparciu o wiedzę z różnych dziedzin biologii i medycyny, na wyróżnienie zasługuje dociekliwość Autora oraz rozważny sposób przeprowadzenia dyskusji.

Interpretację wyników oraz weryfikację stawianej hipotezy badawczej w moim odczuciu należy ocenić wysoko. Jedyna uwaga dotyczy wyjaśnienia wyników uzyskanych w teście wychwytu czerwieni obojętnej (NR). Uważam, że wyników tego testu nie należy interpretować jako zmian w metabolizmie komórek, jak to zostało zasugerowane w tekście, lecz jedynie jako niestabilność lub zaburzenia w ciągłości struktury błon plazmatycznych komórki.

Wnioski opisane zostały sześciu punktach. Bilansują one wszystkie przeprowadzone badania oraz zawierają poprawnie sformułowane spostrzeżenia. Podsumowanie pracy zostało wyodrębnione w formie osobnego rozdziału. Autor zwięźle przedstawia w nim wzajemne zależności między rozwojem raka jelita grubego, a aktywnością układu nerwowego i immunologicznego. Ponadto, przedstawia generalne spostrzeżenie związane z możliwością rozbudowy diagnostyki tego nowotworu o dodatkowe, nieinwazyjne badania, które na podstawie przeprowadzonych w rozprawie doktorskiej analiz, mogą istotnie poprawić wykrywalność i przyspieszyć tym samym leczenie choroby.

Piśmiennictwo obejmuje 257 pozycji, dobranych właściwie. Literatura jest aktualna, i dotyczy badań podjętych w rozprawie doktorskiej.

Podsumowując, stwierdzam że Doktorant w pełni wywiązał się z zadań jakie zostały postawione w celu pracy. Badania są wielowątkowe wykazujące, że neurotransmitery oraz rozpuszczalne mediatory układu immunologicznego mogą regulować proces nowotworzenia zachodzący w jelicie grubym. Uzyskane wyniki wzbogacają więc nie tylko dotychczasową wiedzę dotyczącą rozwoju tego nowotworu, lecz również mogą przejawiać znaczenie praktyczne w diagnostyce tej choroby. Uważam, że Doktorant umiejętnie przeprowadził zarówno rozważania teoretyczne jak i prawidłowo zrealizował część eksperymentalną, udowadniając w ten sposób postawioną hipotezę badawczą oraz swoją dojrzałość do pracy naukowej.

Pracę oceniam wysoko, pomimo drobnych sprostowań, które mają jedynie charakter uściślający wykonane opisy. Nie wpływają one na pozytywną merytoryczną ocenę dysertacji.

Rozprawa doktorska mgr Michała Matysiewicza jest więc opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą dla dysertacji doktorskich.

W zawiązku z powyższym, przedkładaam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie mgr Michała Matysiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wielopłaszczyznowość podjętych badań, istotne poszerzenie wiedzy o wzajemnych relacjach międzyukładowych wpływających na rozwój raka jelita grubego u człowieka, a tym samym potencjalny zakres praktyczny dysertacji wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Michała Matysiewicza stosowną nagrodą.

Zakład Wirusologii i Immunologii UMCS


dr hab. Roman Paduch, prof. nadzw.