

Dr hab. med. Rafał Filip
Zakład Endoskopowych Badań Klinicznych
Instytut Medycyny Wsi
im. Dr Witolda Chodźki w Lublinie

Lublin, 07.07.2014 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej pt. „**Ocena potencjału chemoprewencyjnego melanoidyn izolowanych z ogrzewanego włókna ziemniaczanego typu Potex. Badania *in vitro* w komórkowym modelu glejaka i raka jelita grubego**” wykonanej przez mgr Ewę Langner w Zakładzie Biologii Medycznej Instytutu Medycyny Wsi im. Dr Witolda Chodźki w Lublinie.

W Polsce w 2008 roku współczynnik zachorowalności na raka jelita grubego wynosił odpowiednio 49,4/100 000 dla mężczyzn oraz 25,7/100 000 u kobiet. Co istotne, obserwuje się stały trend zwiększonej zachorowalności zwłaszcza u osób poniżej 50 rz. Do chwili obecnej zidentyfikowano bardzo wiele czynników ryzyka raka jelita grubego, z których, oprócz czynników genetycznych, najistotniejsze wydają się te związane ze stylem życia, jak na przykład: palenie tytoniu, nadużywanie alkoholu, dieta z dużą ilością nasyconych kwasów tłuszczowych i/lub niską zawartością błonnika. Do istotnych czynników niemodyfikowalnych zalicza się: występowanie rjg w rodzinie, wcześniejsze występowanie innych nowotworów oraz wrodzone zespoły polipowatości (np. zesp. Lyncha). Dodatkowo, prawdopodobieństwo wystąpienia rjg zwiększają przewlekłe stany zapalne w obrębie jelita grubego, jak na przykład wrzodziejące zapalenie jelita grubego oraz choroba Crohna.

Wyniki licznych eksperymentów, zarówno *in vitro* jak i *in vivo* wskazują, że naturalne składniki diety mogą hamować rozwój rjg. Potencjał antykarcynogeny jest związany m.in. z indukcją apoptozy oraz modulacją ekspresji genów, których produkty uczestniczą w regulacji cyklu komórkowego. Ponadto, mechanizmy działania obejmują również szlaki metaboliczne związane ze zdolnością do obniżania aktywności licznych czynników prozapalnych oraz aktywacji czynników o działaniu przeciwzapalnym. Efektem dotychczas przeprowadzonych licznych eksperymentów naukowych na modelach zwierzęcych, a także na nowotworowych kulturach komórkowych, są coraz liczniejsze doniesienia o możliwym, protekcyjnym w stosunku do karcynogenów, zastosowaniu wybranych aktywnych składników

diety. Ponadto, w odniesieniu do kilku badanych molekuł, udało się udowodnić ich potencjał w zakresie uwrażliwiania komórek nowotworowych na chemio- i radioterapię.

Podstawowym celem pracy doktorskiej mgr Ewy Langner była ocena potencjału chemoprewencyjnego ekstraktu oraz melanoïdyn izolowanych z ogrzewanego włókna ziemniaczanego typu *Potex* w komórkowym modelu glejaka i raka jelita grubego *in vitro*.

Wstępny zakres prac obejmował wybór spośród 11 ekstraktów przygotowanych z błonnika *Potex* na drodze obróbki termicznej w różnych warunkach temperatura/czas, jednego, mającego najwyższą zdolność do hamowania proliferacji komórek nowotworowych.

Następna faza badań, tj. ocena żywotności/ proliferacji oraz migracji komórek, ocena wpływu na indukcję apoptozy oraz ocena przebiegu cyklu komórkowego oraz na poziom ekspresji białek regulujących przebieg cyklu komórkowego została przeprowadzona na liniach komórkowych glejaka oraz raka jelita grubego. Ponadto doktorantka uwzględniła również wpływ wybranego melanoïdyn ekstraktu z błonnika *Potex* na szlaki przekazywania sygnałów, jak również na ekspresję wybranych genów. Dodatkowo w przeprowadzonych analizach Autorka wykazała w jaki sposób frakcja melanoïdyn wysokocząsteczkowych, jak i frakcja związków niskocząsteczkowych izolowanych z ekstraktu, są zaangażowane w obserwowaną aktywność ekstraktu ogrzewanego błonnika *Potex*.

Przedstawiona do recenzji praca ma charakter oryginalnej rozprawy naukowej o układzie typowym dla tego typu opracowań. Liczy w sumie 125 stron wydruku komputerowego z zachowaniem odpowiednich proporcji między jej częściami. Na wstęp poświęcono 23 strony, materiał i metodyka stanowi 14 stron. Opis wyników zawarto na 39 stronach tekstu oraz udokumentowano je dodatkowo 31 rycinami oraz 10 tabelami, omówienie wyników i dyskusję zawarto na 10 stronach. Piśmiennictwo (zawarte w Rozdziale 9) liczy w sumie 287 pozycji, w tym w zdecydowanej większości anglojęzyczne o tematyce zbieżnej z zakresem pracy.

Pracę rozpoczyna *Wykaz używanych skrótów* stanowiący użyteczny dla czytelnika odnośnik do tekstu.

Wstęp zawarty na stronach 12-35 z powodów redakcyjnych został słusznie podzielony na kilka podrozdziałów. Podrozdział I.1 przedstawia charakterystykę wybranych modelowych nowotworów tj. glejaka oraz raka jelita grubego. Autorka przystępnie i dokładnie przedstawia

przyczyny środowiskowe wyżej wymienionych nowotworów oraz molekularne mechanizmy ich rozwoju uwzględnieniem roli niestabilności genetycznej oraz zaburzeń szlaków przekazywania sygnałów w komórce. Na szczególne podkreślenie zasługuje podrozdział I.3 opisujący w bardzo czytelny sposób funkcje błonnika pokarmowego w organizmie człowieka, jak również znaczenie spożycia błonnika w diecie w aspekcie potencjalnego niwelowania ryzyka rozwoju nowotworów jelita grubego. Ponadto Autorka przedstawia w tym podrozdziale dogłębną charakterystykę błonnika ziemniaczanego typu *Potex* z uwzględnieniem jego składu oraz dotychczasowych zastosowań jako np. dodatku do żywności przetworzonej. W podrozdziale I.4 dokładnie opisano biologiczną aktywność melanoidyn i innych produktów reakcji Maillarda oraz przedstawiono ich dokładną charakterystykę wraz ze wskazaniem ich źródeł w diecie. Z wielką satysfakcją stwierdzam, że zawarte podrozdziale I.2 *Wstępu* dane stanowiące przegląd aktualnego piśmiennictwa oraz bardzo interesujące zestawienie w formie tabeli, szczegółowo i krytycznie wprowadzają czytelnika w tematykę chemoprewencji nowotworów za pomocą naturalnych związków chemicznych zawartych w żywności i mogą stanowić samodzielną pracę przeglądową.

Zwięźle i jasno sformułowany *cel pracy* objął bardzo ambitne zadania nawiązujące do współczesnych problemów żywienia człowieka oraz onkologii. Zdaniem recenzenta dotyczą one bardzo ważnego wątku badań poszukującego substancji pochodzenia naturalnego, w tym przypadku ekstraktu oraz melanoidyn izolowanych z ogrzewanego włókna ziemniaczanego typu *Potex*, o istotnych i możliwych do praktycznego wykorzystania właściwościach chemoprewencyjnych i przeciwnowotworowych.

W rozdziale *Material i metody* Autorka przedstawia zastosowany materiał oraz wykorzystane metody badawcze. Udokumentowała sposób otrzymywania 9 ekstraktów (ogrzewanie i ekstrakcja) błonnika *Potex*, opisano sposób izolacji frakcji melanoidyn oraz określania profilu molekularnego frakcji związków wysokocząsteczkowych oraz niskocząsteczkowych z ekstraktu. Następne podrozdziały przedstawiają charakterystykę samych komórek, przygotowanie oraz przechowywanie hodowli komórkowych jak również skład zastosowanych podłoży i odczynników.

Opis zastosowanych postępowań przygotowawczych i metod analitycznych w celu określenia żywotności, proliferacji, cytotoksyczności oraz zdolności do migracji komórek jest dokładny i wyczerpujący. Dalej, z podobną starannością, autorka opisała tzw. test „drabinki DNA”, w więc sposób określania zdolności do indukcji apoptozy oraz rozdział

elektroforetyczny białek. Generalnie, całość opisów postępowań metodycznych spełnia najwyższe wymagania stawiane współczesnym pracom badawczym, a wyniki świadczą o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu badawczego i jego znajomości praktycznej.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników autorka przeprowadziła przy użyciu programu GraphPad Prism 5.0, a wybór testów należy uznać za odpowiedni dla tego typu badań.

W rozdziale *Wyniki* Autorka prezentuje wyniki badań własnych w formie opisowej (39 stron) oraz odwołuje się do 10 tabel oraz 31 rycin. Na podstawie wyników badań wstępnych, które obejmowały między innymi ocenę cytotoksyczności względem komórek prawidłowych oraz ocenę wpływu na komórki nowotworowe, do dalszych analiz wybrano ekstrakt oznaczony jako „AM4”.

Niektóre wyniki analiz molekularnych wykazały brak wpływu ekstraktu AM4 na ruchliwość komórek glejaka linii C6 oraz na aktywność metaloproteina zarówno w badanych komórkach glejaka, jak i raka jelita grubego linii LS180. Podobnie, nie wykazano wpływu ekstraktu AM4 na indukcję apoptozy w obydwu analizowanych liniach komórkowych. Następnie Doktorantka analizowała kilka innych, niezależnych mechanizmów działania, w tym przede wszystkim wpływ na cykl komórkowy oraz na szlaki przekazywania sygnałów w komórce, a wyniki tych eksperymentów zdecydowanie potwierdziły antyproliferacyjny potencjał wybranego ekstraktu AM4 względem komórek glejaka linii C6 oraz raka jelita grubego linii LS180.

Dodatkowo Autorka podjęła próbę wykazania charakteru związków odpowiedzialnych za antyproliferacyjne właściwości ogrzewanego ekstraktu błonnika. W tym celu zostały ocenione zdolności frakcji nisko- i wysokocząsteczkowych (HMV i LMV) izolowanych z badanego ekstraktu AM4 do hamowania wzrostu badanych komórek nowotworowych i porównane z aktywnością ekstraktu AM4. Wyniki tych eksperymentów wskazują, że zarówno frakcja melanoidyn wysokocząsteczkowych, jak i frakcja związków niskocząsteczkowych izolowanych z ekstraktu, są zaangażowane w antyproliferacyjną aktywność ekstraktu ogrzewanego błonnika Potex. Jednocześnie wykazano większą aktywność frakcji HMW w komórkach glejaka linii C6 oraz frakcji LMW w komórkach raka jelita grubego linii LS180.

Podsumowując, wyniki eksperymentów zasadniczo potwierdziły założone hipotezy badawcze. Biorąc pod uwagę możliwe duże znaczenie praktyczne w dietoprofilaktyce oraz dietoterapii chorób nowotworowych, za najistotniejsze uznałbym wszystkie te dane, które jednoznacznie wskazują możliwy istotny potencjał chemoprewencyjny ekstraktu AM4 oraz

jego frakcji HMV i LMV względem obydwu badanych rodzajów komórek nowotworowych. Słabszą stroną *Wyników* jest brak dokładnych informacji (i badań) na temat składu cząsteczkowego badanego ekstraktu z ogrzewanego włókna *Potex*, co może utrudnić dalsze badania oraz ewentualną komercjalizację uzyskanych wyników. Na szczególne podkreślenie zasługuje bardzo dobre przedstawienie graficzne wyników badań tj. bardzo dobra jakość rycin (zdjęć), przejrzystość i czytelność załączonych tabel oraz dobre opracowanie statystyczne uzyskanych wyników.

W *Dyskusji*, przeprowadzonej na 10 stronach, Autorka skonfrontowała swoje wyniki z wynikami uzyskanymi przez innych autorów i w jasny sposób uwypukliła istniejące rozbieżności, co jest wykładnikiem krytycznego podejścia również i do własnej pracy, ale jednocześnie jest dowodem dogłębnej znajomości opisywanych zagadnień oraz dobrego opanowania warsztatu pisarskiego. Zdaniem recenzenta ciekawym podsumowaniem *Dyskusji* byłoby dokładniejsze określenie zakresu dalszych badań, ale chyba ważniejsze byłoby podjęcie próby odpowiedzi na pytanie, czy uzyskane wyniki mogą być ekstrapolowane również na inne rodzaje nowotworów.

Wnioski. Wnioski opracowane zostały w konwencji 8 punktów, które są uogólnieniem obserwacji zebranych w trakcie realizacji pracy. Nawiązują one do postawionego celu pracy.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na pewne wątpliwości oraz drobne uchybienia zauważone podczas czytania rozprawy.

1. Str 107 (wniosek 7) Autorka wykazała większą aktywność antyproliferacyjną frakcji HMW w komórkach glejaka linii C6 oraz frakcji LMW w komórkach raka jelita grubego linii LS180. Jaka jest przyczyna zaobserwowanej różnicy pod względem działania antyproliferacyjnego frakcji HMV i LMW? Skład frakcji? Czy raczej różnic należy upatrywać w fakcie, że wykorzystano w badaniach dwa odmienne histologicznie typy nowotworów, które mogą dodatkowo różnić się pomiędzy sobą np. w zakresie stopnia złośliwości histologicznej, co bezpośrednio przekłada się na ich różną podatność na czynniki/ substancje potencjalnie hamujące wzrost.

2. Str 97 (*Dyskusja*) [cytuje] „Dodatkowo wykazano, że ekstrakt ogrzewanego błonnika w zakresie stężeń 50 – 1000 µg/ml hamował proliferację komórek raka jelita grubego poprzez zaburzanie procesu syntezy DNA. W komórkach glejaka, badany ekstrakt charakteryzował się znacznie niższą aktywnością, indukując znaczące obniżenie syntezy

DNA jedynie w najwyższym stosowanym stężeniu 1000 µg/ml”. Jak można wytłumaczyć te różnice w zakresie różnej wrażliwości na traktowanie hodowli ekstraktem AM4? Czy podobnie jak w pkt 1?

Korekty wymagają następujące sformułowania.

1. Str. 18 Użyto zwyczajowego określenia „nekroza”. Sugerują posługiwanie się prawidłowymi określeniami histopatologicznymi w języku polskim – „martwica” lub ewentualnie w języku łacińskim – „*necrosis*”.

2. Str. 20 [cytuję] „Niektóre z chorób genetycznych, m.in. rodzinna polipowatość gruczolakowata (FAP, ang. *familial adenomatous polyposis*), poronna rodzinna polipowatość gruczolakowata (AFAP, ang. *attenuated familial adenomatous polyposis*), zespół Gardnera ...”. Zdanie wprowadza czytelnika w błąd, sugerując, iż wymienione zespoły dziedziczne są chorobami genetycznymi, co stawiało by je w jednym rzędzie np. z zespołem Downa czy anemią sierpowatą, a tak nie jest. Sugeruję przeredagowanie zdania.

3. Str. 21 [cytuję] „Zasugerowano związek pomiędzy podwyższonym poziomem białka CRP we krwi, a występowaniem nowotworów jelita grubego [Tsilidis i wsp. 2008]”. Związek poziomu CRP i hCRP z występowaniem rjg jest czysto spekulacyjny. Prawidłowo przeprowadzonych badań i meta analiz dotyczących tego problemu jest bardzo niewiele, a ich wyniki są sprzeczne, włączając w to przytoczone przez autorkę opracowanie Tsidilisa i współ.

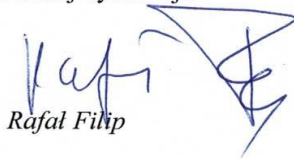
W Pracy pojawiło się również kilka drobnych błędów literowych, jak na przykład na stronach 22 i 35.

Poczynione uwagi mają charakter redakcyjny i nie wpływają na merytoryczną wartość ocenianej dysertacji, a mają na celu uniknięcie nieścisłości i powinny być uwzględnione przed oddaniem jej do druku.

Ocena końcowa

Rozprawa doktorska mgr Ewy Langner jest wartościowym opracowaniem. Badania zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane w oparciu o adekwatne w stosunku do założonego celu metody badawcze. Autorka wykazała się odpowiednią znajomością warsztatu metodycznego, potrafi tę umiejętność odpowiednio wykorzystywać w pracy eksperymentalnej, a otrzymane wyniki prawidłowo zinterpretować.

W zakończeniu przedkładanej recenzji stwierdzam iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Ewy Langner pt. **Ocena potencjału chemoprewencyjnego melanoidyn izolowanych z ogrzewanego włókna ziemniaczanego typu Potex. Badania *in vitro* w komórkowym modelu glejaka i raka jelita grubego odpowiada warunkom** określonym w Art. 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o tytule i stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Wsi im. Dr Witolda Chodźki w Lublinie **o przyjęcie rozprawy** doktorskiej mgr Ewy Langner i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie pragnę podkreślić zdecydowanie ponadprzeciętną pracowitość przeprowadzonych badań oraz duży potencjał aplikacyjny, dlatego też jednocześnie wnioskuję do Wysokiej Rady **o wyróżnienie** recenzowanej dysertacji.


Rafał Filip