

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 właściwości chemoprewencyjnych kompleksów węglowodanowo-białkowych izolowanych z *Boletus edulis* (borowik szlachetny). Badania *in vitro* i molekularne w modelu komórek raka okrężnicy**” wykonanej przez mgr Martę Kingę Lemieszek w Zakładzie Biologii Medycznej Instytutu Medycyny Wsi im. Dr Witolda Chodźki w Lublinie.

W Europie rak jelita grubego jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym. W latach 2004-2008 liczba nowo rozpoznanych przypadków wzrosła z 376 000 do 463 000, co stanowi ponad 13% wszystkich zachorowań na nowotwory złośliwe. Pod względem liczby zgonów, rjg uplasowuje się na drugim miejscu za rakiem płuca. 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.

Wyniki licznych eksperymentów, zarówno *in vitro* jak i *in vivo* wskazują, że naturalne składniki diety mogą hamować rozwój rjg. Potencjał antykarcynogenowy 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. Dodatkowo, w odniesieniu do kilku badanych molekuł, udało się udowodnić ich potencjał w zakresie uwrażliwiania komórek nowotworowych na chemio- i radioterapię. Niestety, pomimo ewidentnych dowodów naukowych świadczących o aktywności przeciwnowotworowej, niewiele z naturalnych składników diety pozytywnie przeszło fazę badań klinicznych, a jeszcze mniej znalazło zastosowanie praktyczne. Główną przyczyną

wyduje się być przede wszystkim brak odpowiednich markerów skuteczności chemoprewencji rjg, a także relatywnie długi okres konieczny do przeprowadzenia odpowiednich badań klinicznych oraz konieczność rekrutacji dużych grup pacjentów. Jednakże z chemoprewencją rjg wciąż wiązane są duże nadzieje, co znajduje wyraz między innymi w konkretnych zaleceniach i badaniach w wybranych grupach pacjentów, jak na przykład w odniesieniu do mesalaminy czy kwasu acetylosalicylowego.

Podstawowym celem pracy doktorskiej mgr Marty Kingi Lemeieszek była ocena chemoprewencyjnego potencjału kilku frakcji zawierających kompleksy węglowodanowo-białkowe izolowanych z grzyba *Boletus edulis* w odniesieniu do komórek gruczolakoraka jelita grubego. Wstępny zakres prac obejmował wybór frakcji o najwyższym potencjale w zakresie chemoprewencji przy jednoczesnej małej toksyczności w odniesieniu do prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego. Następną fazą badań, tj. ocena właściwości chemoprewencyjnych i przeciwnowotworowych wcześniej wybranej frakcji, została podzielona została na kilka etapów: ocena wpływu na indukcję apoptozy, przebieg cyklu komórkowego oraz na poziom ekspresji białek regulujących przebieg cyklu komórkowego. Ponadto doktorantka uwzględniła również wpływ wybranej frakcji na szlaki przekazywania sygnałów, jak również na ekspresję wybranych genów.

Przedstawiona do recenzji praca ma charakter oryginalnej rozprawy naukowej o układzie typowym dla tego typu opracowań. Liczy w sumie 132 strony wydruku komputerowego z zachowaniem odpowiednich proporcji między jej częściami. Na wstęp poświęcono 25 stron, materiał i metodyka stanowi 18 stron. Opis wyników zawarto na 25 stronach tekstu oraz udokumentowano je dodatkowo 24 rycinami (wykresy oraz fotografie), omówienie wyników i dyskusję zawarto na 10 stronach. Piśmiennictwo (zawarte w Rozdziale 5) liczy w sumie 386 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 12-37 z powodów redakcyjnych został słusznie podzielony na kilka podrozdziałów. Podrozdział 1.1 przedstawia przyczyny środowiskowe rjg oraz molekularne mechanizmy rozwoju rjg z uwzględnieniem roli niestabilności genetycznej oraz zaburzeń szlaków przekazywania sygnałów odpowiedzialnych za rozwój rjg. Na szczególne podkreślenie zasługuje podrozdział 1.2 opisujący w bardzo czytelny sposób

chemoprewencyjne i przeciwnowotworowe właściwości polisacharydów izolowanych z *Basidiomycota*. W podrozdziale 1.3 dokładnie opisano prozdrowotne właściwości Borowika szlachetnego (*Boletus edulis*) oraz przedstawiono jego dokładną charakterystykę. Z wielką satysfakcją stwierdzam, że zawarte we *Wstępie* dane stanowiące przegląd aktualnego piśmiennictwa bardzo szczegółowo wprowadzają czytelnika w molekularne mechanizmy rozwoju rjg i mogą stanowić samodzielną pracę przeglądową.

Zwięźle i jasno sformułowany *cel pracy* objął bardzo ambitne zadania nawiązujące do współczesnych problemów onkologii oraz biologii molekularnej. Moim zdaniem dotyczą one bardzo ważnego wątku badań poszukującego substancji, w tym przypadku frakcji izolowanych z *Boletus edulis*, o istotnych i możliwych do praktycznego wykorzystania substancji naturalnych o właściwościach chemoprewencyjnych i przeciwnowotworowych.

W rozdziale *Material i metody* Autorka przedstawia zastosowany materiał oraz wykorzystane metody badawcze. Dokładnie przedstawiono sposób otrzymywania frakcji zawierających badane kompleksy węglowodanowo-białkowe, a także charakterystykę samych komórek, przygotowanie hodowli komórkowych oraz skład zastosowanych podłoży i odczynników. Opis zastosowanych postępowań przygotowawczych i metod analitycznych w celu określenia aktywności antyproliferacyjnej, cytotoksyczności czy też indukcji apoptozy i śmierci komórek jest bardzo staranny i dokładny. Taką też dokładność mają opisy oznaczania wpływu na białka regulujące przebieg cyklu komórkowego oraz szlaki przekazywania sygnałów w komórce. Trafnie dobrano ocenę wpływu wybranej frakcji zarówno na ekspresję genów, jak i na wyciszenie ekspresji wybranych genów w komórkach nowotworowych. 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.

Przyjęte testy statystyczne nie odbiegają od standardów światowych a ich wybór należy uznać za odpowiedni.

W rozdziale *Wyniki* Autorka prezentuje wyniki badań własnych w formie opisowej (25 stron) oraz odwołuje się do 24 rycin. Wstępne wyniki badań jednoznacznie wykazują brak negatywnego wpływu wybranej frakcji *Boletus edulis* na prawidłowe komórki nabłonka jelita grubego. Natomiast wyniki analiz molekularnych potwierdziły chemoprewencyjne właściwości wybranej frakcji BE3 względem komórek raka okrężnicy dwóch wybranych

linii: LS180 i HT-29. Autorka analizowała kilka niezależnych możliwych mechanizmów działania, w tym przede wszystkim wpływ na indukcję apoptozy, proliferację komórek, cykl komórkowy oraz szlaki przekazywania sygnałów w komórkach rjg. Wyniki eksperymentów były zbieżne i potwierdziły założone hipotezy badawcze. Biorąc pod uwagę możliwe duże znaczenie praktyczne w dietoterapii, a nawet w leczeniu nowotworów, za najistotniejsze uznałbym wszystkie te dane, które jednoznacznie wskazują duży potencjał terapeutyczny frakcji BE3 względem komórek rjg. Słabszą stroną pracy jest brak informacji na temat składu badanej frakcji BE3 ekstraktu z *Boletus edulis*, co może hamować wprowadzenie substancji do dalszych faz badań np. eksperymentów na zwierzętach oraz ewentualnych badań klinicznych u ludzi. Ponadto, zdaniem recenzenta, może stać się również przeszkodą w komercjalizacji uzyskanych wyników. Na szczególne podkreślenie zasługuje bardzo 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.

Wnioski. Wnioski opracowane zostały w konwencji 10 punktów, które są uogólnieniem obserwacji zebranych w trakcie realizacji pracy. Nawiązują one do postawionego celu pracy.

Pytania, na które nie znalazłem odpowiedzi w tekście pracy:

1. Str. 47 Dlaczego analizowano frakcje uzyskane z Borowika szlachetnego pochodzącego z Portugalii? Czy decyzja podyktowana była lokalizacją ośrodka kooperującego tj. Chemistry Department, University of Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real (Portugalia)?

2. Str. 68 oraz str. 97 (wniosek 5) Jaka jest przyczyna zaobserwowanej różnicy (cystometria przepływowa) pod względem wpływu frakcji BE 3 na cykl komórkowy w komórkach rjg? Ekspozycja komórek linii LS 180 skutkowała ich akumulacją w fazie G0/G1, natomiast w przypadku komórek HT-29 pod wpływem BE3 odnotowano ich akumulację w fazie S cyklu komórkowego.

3. Str 97 (wniosek 3) [cytuje] „IC50 obliczone dla BE3 na podstawie wyników testu BrdU wyniosło dla komórek linii LS180 10.3 µg/ml, natomiast dla komórek linii HT-29 132.2

µg/ml”. Jak można wytłumaczyć tę ponad dziesięciokrotną różnicę w zakresie IC50 w odniesieniu co prawda do dwóch różnych linii komórkowych, ale jednak wciąż tego samego typu nowotworu?

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

Korekty wymagają następujące sformułowania.

1. Str. 13 [cytuje] „Błonnik ułatwia ich wydalanie z organizmu, zapobiegając akumulacji substancji niebezpiecznych ze względu na tworzenie się ognisk zapalnych prowadzących często do owrzodzeń, a następnie do zmian nowotworowych”. Zdanie wprowadza czytelnika w błąd, sugerując, iż powstanie nowotworu jelita grubego poprzedzone jest owrzodzeniami, co nie jest prawdą. Wymienione substancje szkodliwe znajdujące się w świetle jelita grubego (tj. nitrozaminy, fenole, skatole, indole, kwasy żółciowe) w warunkach fizjologicznych, nawet przy diecie ubogo błonnikowej, nie indukują powstawania owrzodzeń lub nadżerek w jelicie. Ponadto, we wspomnianym akapicie warto również dodać informację, że główną zaletą błonnika pokarmowego jest skracanie kontaktu powyższych substancji ze ścianą jelita grubego.

2. Str. 17 [cytuje] „Model ten powstał dzięki obserwacjom histopatologicznym i klinicznym, pokazującym, że większość złośliwych guzów w jelicie grubym powstaje z wcześniej istniejących gruczolaków, które stopniowo zwiększają swoje rozmiary i stopień inwazyjności.” Sformułowanie nie jest precyzyjne i wymaga korekty. W odniesieniu do gruczolaków jelita, które są nowotworami łagodnymi, nie powinno używać się określenia „inwazyjność”. Sformułowanie to zarezerwowane jest dla nowotworów złośliwych. Sądzę, że w tym przypadku użycie sformułowania „stopień dysplazji” lub „zaawansowanie zmian dysplastycznych” w gruczolaku jelita grubego było by bardziej stosowne.

3. Str. 20 Ryc. 1. Nie znalazłem w tekście pracy ani w tekście pod ryciną informacji lub też definicji gruczolaków „wczesnych” oraz „późnych”. Najprawdopodobniej chodzi o stopień zaawansowania zmian dysplastycznych w polipach oraz ich wielkość. Dla podniesienia wartości pracy sugeruję uzupełnienie tekstu pracy o te definicje.

4. Str. 20 [cytuje] „... u podstaw m.in. HNPCC (dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością - *hereditary nonpolyposis colon cancer*)...” sugerowałbym raczej konsekwentne stosowanie najpierw pełnej nazwy angielskiej a dopiero w następnej kolejności polskiego tłumaczenia skrótów z języka angielskiego.

5. Str. 25 [cytuję] „... zbiega się to w czasie z przekształceniem gruczolaka w zaawansowaną dysplazję lub nowotwór)...” Sugeruję przeredagowanie np. „...zbiega się to w czasie z rozwojem zaawansowanych zmian dysplastycznych w gruczolaku lub też jego przekształceniem w nowotwór złośliwy...”.

6. Str. 27 (i nie tylko) – należy uporządkować stosowaną nomenklaturę nowotworów, np. kilkakrotnie użyto zwyczajowego określenia „sarkoma”. Sugerują posługiwanie się prawidłowymi określeniami histopatologicznymi w języku polskim – „mięsak złośliwy” lub ewentualnie w języku łacińskim – „*sarcoma*”.

7. Str. 27 [cytuję] „... gruczolak sutkowy...”. Najprawdopodobniej chodzi o gruczolak sutka?

8. Str. 88 – podobnie jak pkt. 6 kilkakrotnie użyto zwyczajowego określenia „nekroza”. Sugerują posługiwanie się prawidłowymi określeniami histopatologicznymi w języku polskim – „martwica” lub ewentualnie w języku łacińskim – „*necrosis*”.

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 Marty Kingi Lemieszek 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 Marty Kingi Lemieszek pt. **Ocena właściwości chemoprewencyjnych kompleksów węglowodanowo-białkowych izolowanych z *Boletus edulis* (borowik szlachetny). Badania *in vitro* i molekularne w modelu komórek raka okrężnicy** 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 Marty Kingi Lemieszek 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

