

R E C E N Z J A

rozprawy doktorskiej

mgr Adrianny Dudek

pt. „Indukowanie różnicowania monocytów do makrofagów czynnikami wydzielanymi przez komórki raka jelita grubego”

Analiza trendów czasowych wskaźników epidemiologicznych (wg danych WHO, Międzynarodowej Agencji Badań Nad Rakiem (IARCC) oraz Międzynarodowej Unii Przeciwrakowej (UICC) wskazuje na wzrost zagrożenia nowotworami, które są największym wyzwaniem zdrowia publicznego w Polsce i na świecie w XXI wieku.

W Europie rocznie chorobę nowotworową rozpoznaje się u 1,7 mln osób, zaś 962 000 chorych umiera. W Polsce rocznie rozpoznaje się 160 000 nowych przypadków zachorowań i ponad 90 000 zgonów. Przyczynami tego zjawiska są zmiany w strukturze demograficznej populacji (starzenie się populacji), ekspozycja na karcinogeny oraz przewlekłe zakażenia.

Rak jelita grubego jest drugim pod względem częstości występowania nowotworem złośliwym w Polsce, bowiem rocznie rozpoznaje się ponad 15 000 nowych zachorowań. Od ok. 30 lat następuje systematyczny wzrost zachorowań na raka jelita grubego a liczba zachorowań od lat 80-tych wzrosła 3-4 krotnie.

Niekorzystna sytuacja epidemiologiczna powoduje, że wiele ośrodków naukowych prowadzi badania nad czynnikami sprzyjającymi onkogenezie. W Polsce wprowadzono Program Badań Przesiewowych, którego celem jest ograniczenie zachorowalności oraz umieralności z powodu tego nowotworu.

W etiopatogenezie raka jelita grubego odgrywają rolę zarówno czynniki genetyczne jak i środowiskowe. Jest to nowotwór pochodzenia nabłonkowego umiejscowiony w końcowym odcinku przewodu pokarmowego: kątnicy, okrężnicy lub odbytnicy. Choroba rozwija się w wyniku stopniowego gromadzenia się zmian genetycznych i epigenetycznych, prowadząc w końcu do transformacji zdrowej błony śluzowej jelita w inwazyjną postać raka.

Blisko 95% wszystkich diagnozowanych przypadków nowotworów złośliwych jelita grubego to gruczolakoraki (adenocarcinoma), rzadziej występuje rak płaskonabłonkowy.

Choroba często przebiega bez klinicznie jawnych objawów, aż do późnego stadium, ze złym rokowaniem oraz wysoką śmiertelnością.

Onkogeneza jest procesem wieloetapowym z długim okresem utajenia, kiedy to komórka prawidłowa zmienia swój fenotyp na nowotworowy. Wskutek gromadzenia się zmian genetycznych komórki nowotworowe uzyskują zdolność do niekontrolowanych podziałów, zatrzymania procesów apoptozy, stymulacji angiogenezy czy wreszcie naciekania i tworzenia przerzutów.

Wybór tematu przez Doktorantkę jest zatem uzasadniony i wpisuje się w światowy trend badań nad etiopatogenezą raka jelita grubego. Badania zostały wykonane w ramach grantu badawczego Sonata NCN, nr 2013/09/D/NZ6/02564.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska liczy 162 strony wydruku komputerowego. Układ pracy i kolejność rozdziałów jest typowa dla prac doktorskich (Wstęp, Cel pracy, Materiał i Metody, Wyniki badań, Omówienie wyników i dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo). Do pracy dołączono streszczenie w języku polskim i angielskim, spis rycin i tabel oraz wykaz skrótów używanych w pracy.

We Wstępie zawartym na 40 stronach Autorka omówiła komórki układu immunologicznego, ze szczególnym uwzględnieniem monocytów i makrofagów związanych z nowotworem. Opisała także cytokiny i chemokiny odgrywające ważną rolę w aktywacji proliferacji oraz apoptozie komórek. W końcowej części wstępu przedstawiono budowę i funkcje jelita grubego, czynniki ryzyka raka jelita grubego, klasyfikację tego nowotworu wg zróżnicowania histologicznego (cecha G) oraz klasyfikację TNM. Na końcu Autorka scharakteryzowała mikrośrodowisko nowotworu, które odgrywa bardzo ważną rolę w rozwoju nowotworu i tworzeniu przerzutów.

Główny cel pracy oraz cele pośrednie zostały sformułowane w sposób jasny i precyzyjny.

Rozdział Materiały zawiera opisy stosowanych w doświadczeniach własnych odczynników, hodowli komórkowych, zestawów do izolacji, amplifikacji i detekcji materiału genetycznego wirusa. W części Metody opisano szczegółowo procedury hodowli komórek, izolacji DNA, RNA metodą PCR i RT PCR oraz badań serologicznych. Doktorantka posługiwała się także komercyjnie dostępnymi zestawami diagnostycznymi a wszystkie badania doświadczalne zostały wykonane zgodnie z instrukcją producentów testów.

Każdy nowotwór rozwija się w pewnym mikrośrodowisku złożonym z komórek prawidłowych i nowotworowych, umożliwiającym komórkom nowotworowym ucieczkę

przed mechanizmami obronnymi gospodarza, z drugiej zaś strony sprzyja angiogenezie, czyli powstawaniu nowych naczyń. W okolicę rozwijającego się nowotworu migrują z krwiobiegu monocyty i makrofagi, które z formy prozapalnej M1 przekształcają się w formę immunosupresyjną M2 sprzyjającą progresji guza.

Głównym założeniem Doktorantki było więc zbadanie w jaki sposób czynniki wydzielane przez komórki raka jelita grubego wpływają na różnicowanie monocytów do makrofagów. Aby osiągnąć zamierzony cel sformułowała kilka celów pośrednich, tj. ocenę czy nowotwór ten powoduje różnicowanie makrofagów do prozapalnej i przeciwnowotworowej populacji M1 i supresyjnej, pronowotworowej M2, a także ocena czy stadium nowotworu wpływa na różnicowanie makrofagów.

Badania przeprowadzono w liniach komórkowych pochodzących z czterech różnych stadiów raka jelita grubego (HT29, LS180, SW948 i SW620) a podłoże pochodzące z tych linii zastosowano jako model mikrośrodowiska nowotworu. Kontrolę stanowiła linia HDF wyprowadzona z ludzkich fibroblastów skóry. Modelem ludzkich monocytów była linia białaczkowa THP-1.

Określono poziom wybranych cytokin produkowanych przez monocyty i makrofagi, tj. VEGF, IL-10, IL-6 oraz ekspresje genów kodujących białka biorące udział w progresji i metastazie. W końcowym etapie badań oceniono bezpośredni wpływ podłoża pochodzącego na produkcję białek odpowiedzialnych za tworzenie przerzutów (gelektyna 3 i 9) oraz metaloproteinazy 9 (MMP-9). Do tego celu zastosowano metodę western-blot oraz zymografię żelatynową.

Wyniki badań zostały bardzo szczegółowo opisane oraz przedstawione graficznie na 62 rycinach.

Omówienie wyników badań wraz z dyskusją Doktorantka zawarła na 10 stronach maszynopisu, gdzie przeprowadziła szczegółową analizę wyników badań własnych na tle wyników uzyskanych przez innych autorów. Krytyczna ocena piśmiennictwa świadczy o dużej znajomości tematu i bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Autorki. Z przeprowadzonych badań Doktorantka wysnuła 12 poprawnie sformułowanych i uzasadnionych wniosków, które jednak dla przejrzystości uzyskanych wyników można byłoby pogrupować.

Otrzymane wyniki wskazują, że nowotworowe podłoża pochodzące przyspieszają przekształcanie się monocytów w makrofagi, obniżają ich proliferację i zatrzymują cykl

komórkowy w fazie G1. Ponadto pobudzają produkcję wolnych rodników oraz ekspresję markerów charakterystycznych dla subpopulacji M1 i M2 makrofagów. Wykazano także wzrost ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w onkogenezie. Ponadto stwierdzono wzrost stężenia cytokin, galektyny oraz metaloproteinaz. Uzyskane wyniki wskazują kierunek ewentualnych dalszych badań nad rolą mikrośrodowiska nowotworu, szczególnie w tworzeniu przerzutów. Badania te mogą przyczynić się do wyodrębnienia biomarkerów, które mogą stanowić punkt uchwytu dla potencjalnych leków mogących hamować różnicowanie się monocytów i makrofagów w komórki promujące rozwój raka jelita grubego.

Piśmiennictwo liczy 150 pozycji, w zasadzie literatury anglojęzycznej i jest prawidłowo cytowane w pracy.

Uważam, że praca mgr Adrianny Izabeli Dudek pt. „*Indukowanie różnicowania monocytów do makrofagów czynnikami wydzielanymi przez komórki raka jelita grubego*” stanowi Jej oryginalny dorobek i spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Przewożę zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Skłodowskiej-Curie w Lublinie wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Adrianny Dudek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wagę problemu, dużą pracochłonność badań oraz zastosowane nowoczesne techniki badawcze, stawiam wniosek o jej wyróżnienie.

KIEROWNIK
Zakładu Wirusologii

prof. dr hab. Małgorzata Palz-Dacewicz