Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędowicz
Kierownik Pracowni Molekularnych Podstaw
Ruchów Komórkowych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Warszawa, 7 kwietnia 2025 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Olszańskiej
pt.: "Wzajemne interakcje komórek raka jelita grubego z adipocytami,
będącymi elementem niszy nowotworowej" wykonanej w Zakładzie Patologii Komórki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem promotor prof. dr hab. Doroty Nowak
i promotor pomocniczej dr Katarzyny Pietraszek-Gremplewicz

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa dotyczy ważkiego problemu poznania patomechanizmu rozwoju raka jelita grubego, schorzenia niechlubnie przodującego w statystykach występowania (trzecie miejsce) i śmiertelności (drugie miejsce) nowotworów. Doktorantka postanowiła poszerzyć dotychczasowe podejścia badawcze o uwzględnienie w rozwoju choroby oddziaływania pomiędzy komórkami raka jelita grubego i tkanki tłuszczowej, co ma szczególne znaczenie w kontekście poznanego związku tego nowotworu z otyłością pacjentów. Doktorantka w toku dobrze zaplanowanych i przemyślanych doświadczeń wykazała wzajemną interakcję obu typów komórek, gdyż zarówno komórki rakowe powodują zmiany w adipocytach (m.in. aktywacja metabolizmu lipidów i glukozy), jak i adipocyty wpływają na komórki raka jelita grubego, zwiększając ich proliferację i inwazyjność. Badania Doktorantki, wykonane w ramach projektu badawczego OPUS 22 kierowanego przez promotor rozprawy, prof. Dorotę Nowak, dostarczyły nowych informacji o mechanizmach rozwoju jelita grubego, które mogą być potencjalnie wykorzystane do opracowania skutecznych strategii leczenia, ukierunkowanych na interakcję pomiędzy adipocytami i komórkami raka jelita grubego.

Formalny opis rozprawy

Licząca 171 stron rozprawa doktorska mgr Joanny Olszańskiej została przygotowana w formie tradycyjnej monografii i posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich. Praca jest zredagowana w sposób staranny, napisana poprawną polszczyzną

Część merytoryczna rozpoczyna się *Streszczeniami* w języku polskim (2 strony) i angielskim (2 strony), po nich znajduje się wyczerpujący *Wykaz skrótów* (4 strony) oraz liczący 29 stron *Wstęp*, który zawiera 12 rycin/schematów). *Cel pracy* sprecyzowano na mniej niż stronie. Rozdział *Materiały i odczynniki* zostały opisane na 14 stronach; doktorantka przedstawiła szczegółowe informacje dotyczące m.in. składu używanych roztworów, stosowanych przeciwciał i ich rozcieńczeń w postaci 10 tabel. *Metody* Doktorantka opisała na 30 stronach, posiłkując się zarówno rycinami (6), jak i tabelą. *Wyniki* zostały opisane na 46 stronach i zawierają 28 złożonych rycin. Doktorantka przedstawiła również *Podsumowanie wyników* (ok. pół strony tekstu i jedna rycina/schemat), w którym zwięźle dokonała podsumowania rezultatów swoich badań. Kolejna część to *Dyskusja*, przedstawiona na 19 stronach, po której następują przedstawione w postaci punktów *Wnioski* (ok. pół strony) oraz *Wykaz osiągnięć naukowych* Doktorantki, a także *Podziękowania*, które z reguły zamieszcza się samym początku rozprawy i nie stanowią one odrębnego, numerowanego rozdziału, jak to ma miejsce w przypadku ocenianej tu rozprawy.

Doktorantka jest współautorką czterech artykułów, w tym dwóch o charakterze przeglądowym, które zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR; w dwóch publikacjach jest pierwszym autorem. To spory dorobek zważywszy na początek drogi naukowej Doktorantki i okres pandemii, na który przypadały pierwsze lata jej pracy doświadczalnej. Doktorantka brała także udział w konferencji międzynarodowej, gdzie prezentowała swoje wyniki w postaci posteru. Rozprawę zamyka *Bibliografia* zawierająca 384 pozycje.

Ocena merytoryczna

Wstęp to podsumowanie dotychczasowej wiedzy o tematyce prowadzonych przez Doktorantkę badań, a w szczególności etiopatologii i biologii raka jelita grubego oraz roli otyłości w jako czynnika ryzyka powstania tego nowotworu. Doktorantka omawia również literaturę poświęconą wzajemnym zależnościom pomiędzy adipocytami i komórkami nowotworu oraz opisuje modele badawcze (*in vitro*), które są najczęściej stosowane w badaniach nad tymi oddziaływaniami, podkreślając zalety i wady każdego z modeli. Omówione w bogato ilustrowanym *Wstępie* zagadnienia doskonale wprowadzają czytelnika w lekturę dalszych części rozprawy, a zwłaszcza *Wyników i Dyskusji.* Nie mam merytorycznych uwag do tej części rozprawy, jego lektura pozwala na stwierdzenie, że Doktorantka opanowała teoretyczną wiedzę związaną z tematyką rozprawy. Z obowiązku recenzenta muszę jednak zauważyć, że po polsku organ to narząd, układ immunologiczny to układ odpornościowy, a rozwinięcie pełnej nazwy genu *APC* to gen gruczolakowatej polipowatości jelita grubego, a nie (...) coli.

Nadrzędnym *Celem* Doktorantki było poznanie mechanizmów wzajemnego oddziaływania pomiędzy adipocytami, a komórkami raka jelita grubego, zagadnienia, które jest mało poznane, szczególnie w kontekście tego nowotworu. A tak na marginesie, czy wiadomo coś o wzajemnym oddziaływaniu adipocytów i komórek ściany jelita grubego w warunkach niepatologicznych? Tę część rozprawy Doktorantka potraktowała trochę po macoszemu, nie tylko nie przedstawiła tu założeń pracy, ale i hipotezy badawczej. Jednym z celów badawczych, od których Doktorantka rozpoczęła badania to analiza wpływu tuczenia na ludzkie adipocyty; to zagadnienie wprawdzie związane z szeroko pojętą tematyką Jej badań, ale moim zdaniem rozprawa nie straciłaby na wartości bez uwzględnienia tej części wyników.

Dla realizacji swoich zamierzeń Doktorantka wykorzystała kilka komercyjnie dostępnych linii komórkowych, w tym mysie fibroblasty, komórki raka jelita grubego pochodzące z guzów pierwotnych (dwie linie) i przerzutów pacjentów oraz preadipocyty z podskórnej tkanki podskórnej dawców, a także preadipocyty pozyskane od dawców w ramach współpracy z Gdańskim Uniwersytetem Medycznym. Na marginesie, czy wiadomo coś o płci dawców badanych typów komórek, co może być ważne w kontekście obserwowanych różnic w poszczególnych liniach komórkowych? Doktorantka szczegółowo opisuje stosowane materiały i bufory, w tym także ich pochodzenie. Dbałość o szczegółowy opis dotyczy również stosowanych metod, których wachlarz jest bardzo szeroki - od prowadzenia hodowli komórkowych (w tym ko-kultur), poprzez szereg testów funkcjonalnych i biochemicznych po obrazowanie komórek i analizy statystyczne uzyskanych wyników. Doktorantka przejrzyście opisuje stosowane metody, posiłkując się - co jest warte podkreślenia - schematami ułatwiającymi lekturę tej znacznej części rozprawy. Mam kilka drobnych uwag: (i) test zarastania rysy (ang. *wound healing test*) jest miarą migracji komórek, natomiast przy teście trwającym 24 godziny znaczący wkład w uzyskany wynik ma również proliferacja komórek, co ma szczególne znaczenie w przypadku zazwyczaj szybko dzielących się komórek nowotworowych, o czym Doktorantka nie wspomniała. Na szczęście migracja komórek była oceniona również inną metodą; (ii) zastanawia mnie, dlaczego Doktorantką do analiz densytometrycznych jako metodę normalizacji wybrała analizę barwienia czerwienią Ponceau; rozumiem, że pomiaru dokonywano dla całej ścieżki; (iii) czy rozdziały elektroforetyczne były na pewno prowadzone w 10% żelach poliakryloamidowych, bo prążki wybarwione Ponceau wydają się być zbyt blisko siebie jak na to stężenie akryloamidu (o ile to faktycznie są całe ścieżki...)?

Pomimo tych kilku drobnych uwag pragnę podkreślić, że wysoko oceniam część rozprawy poświęconej materiałom i metodom, została ona przygotowana bardzo starannie, z pewnością umożliwi skorzystanie z zawartych tu informacji przez osoby kontynuujące badania.

Bardzo wysoko oceniam również sposób przedstawienia *Wyników*, wszystkie ryciny są czytelne, dane są klarownie opisane i właściwie zanalizowane statystycznie. Każdy podrozdział rozpoczyna się od krótkiego wprowadzenia i kończy podsumowaniem, także w formie przejrzystego schematu, co ułatwia lekturę tego obszernego rozdziału.

Doktorantka rozpoczęła badania od oceny wpływu tuczenia na ludzkie adipocyty (w warunkach imitujących tuczenie w organizmie), czego dokonała poprzez inkubację preadipocytów bądź z mieszaniną soli kwasów tłuszczowych bądź w samej pożywce hodowlanej. Wykazała, że komórki „tuczone" zawierały w stosunku do komórek kontrolnych większe krople tłuszczowe, miały podwyższony poziom genów kodujących białka odpowiedzialne za stabilizację kropli lipidowych (m.in. perilipinę 1) oraz genów kodujących główne transportery tłuszczu (FABP4, FABP5 i CD 36). Nie zaobserwowała natomiast istotnych różnic w poziomie enzymów zaangażowanych w metabolizm lipidów (a co z ich aktywnością?), mimo spadku poziomu ich mRNA. Doktorantka zaniechała jednak kontynuowania tuczenia, uzasadniając to brakiem znaczących zmian w badanych komórkach. Tak jak napisałam wcześniej, rozprawa byłaby bardziej spójna bez zamieszczania tych wyników.

Kolejny etap to optymalizacja procedury otrzymywania adipocytów związanych z nowotworem (CAA), którą prowadzono z wykorzystaniem jednej z linii komórek nowotworu jelita grubego (CRC) i fibroblastów, które po odpowiednim traktowaniu nabierają cech dojrzałych adipocytów. Doktorantka prowadziła hodowlę mysich fibroblastów w obecności czynników stymulujących i wykazała, że do zajścia procesu różnicowania fibroblastów w adipocyty wymagany jest okres 14 dni, a przekształcenie ich w CAA wymaga co najmniej siedmiodniowej ko-kultury z komórkami nowotworu jelita grubego. Ko-kultura pośrednia była prowadzona z wykorzystaniem systemu Transwell®, uniemożliwiającego bezpośrednie oddziaływanie obu typów komórek, a jednocześnie tworząc warunki zbliżone do pewnego stopnia do tych obecnych w środowisku nowotworu. Mając tak opracowany harmonogram traktowania komórek i ko-hodowli komórek CAA i CRC, Doktorantka przystąpiła do realizacji głównego celu badań, a więc poznania wzajemnych oddziaływań pomiędzy adipocytami i CRC, wykorzystując posiadane trzy linie ludzkich CEC.

Analiza wszystkich trzech układów wykazała, że o ile poszczególne linie CRC w podobny sposób oddziałują na adipocyty, przekształcając je w CAA, to już efekt zmian w poszczególnych badanych parametrach różnił się pomiędzy badanymi liniami. Transformowane adipocyty charakteryzowała obniżona zawartość obojętnych lipidów, co - jak wykazała Doktorantka - może wynikać z obniżonego poziomu transkryptów i białek zaangażowanych w metabolizm lipidów. Trochę szkoda, że Doktorantka nie pokusiła się o ilościową analizę zawartości lipidów z wykorzystaniem specyficznych zestawów lub też chromatografii gazowej, mogłoby to dostarczyć więcej informacji. Ko-kultura z komórkami nowotworowymi powodowała również w CAA aktywację procesu glikolizy beztlenowej, charakterystycznego dla komórek nowotworowych, a także wzrost poziomu metaloproteinazy 2 (MMP2), enzymu modyfikujące macierz zewnątrzkomórkową, co również cechuje komórki nowotworowe.

Kolejny cykl badań to analiza wpływu adipocytów CAA na komórki CRC zarówno w warunkach ko-hodowli, jak i traktowania CRC pożywką kondycjonowaną, zebraną znad hodowli adipocytów i CAA. W toku dobrze zaplanowanych i przemyślanych doświadczeń Doktorantka wykazała w CRC wzrost proliferacji, migracji i inwazyjności oraz zmian w metabolizmie, co przejawiało się gromadzeniem kropli lipidowych oraz wzrostem poziomu nie tylko lipidów, ale także transporterów glukozy i mleczanów. Zmiany te były najbardziej widoczne w ko-hodowli, szczególnie w komórkach linii LoVo, wywodzącej się z przerzutu, a więc potencjalnie najbardziej inwazyjnych.

Co ciekawe, nie zaobserwowała zmian w żywotności CRC po traktowaniu ich pożywką kondycjonowaną, zebraną z hodowli CAA i adipocytów. Sekretom adipocytów i CRC stymulował natomiast ich migrację i gromadzenie kropli lipidowych.

Dyskusja jest wyczerpująca, szczegółowo odnosząca się do zagadnień dotyczących poszczególnych partii uzyskanych wyników. Wprowadzeniem do dyskusji jest *Podsumowanie wyników*, w którym Doktorantka poza bardzo esencjonalnym omówieniem swoich wyników przedstawiła rycinę, która w sposób graficzny ilustruje te obserwacje. Moim zdaniem ta część mogłaby stanowić integralną składową *Dyskusji*. Lektura *Dyskusji* pozwala na stwierdzenie, że Doktorantka ma doskonałą wiedzę w tematyce rozprawy, którą potrafi umiejętnie zastosować w zrozumieniu znaczenia uzyskanych przez siebie danych, wyciąga prawidłowe wnioski i wskazuje przyszłe kierunki badań. W części *Wnioski* Doktorantka wypunktowuje wyciągnięte konkluzje, w większym stopniu dotyczącym wzajemnej interakcji pomiędzy adipocytami i komórkami raka jelita grubego.

Analiza spisu literatury wskazuje na właściwie dobrane pozycje, w zdecydowanej przewadze (bo aż ~84%) to publikacje powstałe w minionej dekadzie (2014-2024), co niewątpliwie świadczy o aktualności badań prowadzonych w zespole prof. D. Nowak, w tym przez Doktorantkę.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Olszańskiej ma dużą wartość nie tylko poznawczą, ale i aplikacyjną, wnosi bowiem nowe informacje o wzajemnej interakcji pomiędzy tkanką tłuszczową i komórkami nowotworowymi, które mogą być w przyszłości wykorzystane do opracowania skutecznych strategii przeciwnowotworowych. Praca jest w zasadzie spójna tematycznie (o wątpliwościach zamieszczenia części dotyczących oceny wpływu tuczenia na ludzkie adipocyty napisałam powyżej) z wyraźnie postawionym celem i kolejno stawianymi ambitnymi zadaniami, które Doktorantka zrealizowała w całej rozciągłości. Trudny i wyjątkowo obszerny zakres badań, niezwykle bogaty warsztat metodyczny oraz bardzo dobrze udokumentowane, oryginalne wyniki świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do samodzielnej pracy naukowej. Wykazała się ona umiejętnością zdefiniowania problemu badawczego i jego rozwiązania, a także zdolnością do krytycznej analizy własnych wyników badań w oparciu o dane literaturowe. Uzyskane przez nią wyniki są nowatorskie i stanowią podstawę do dalszych badań, zaś wyciągnięte w rozprawie wnioski uzasadnione. Przedstawione w recenzji uwagi i krytyczne komentarze nie umniejszają bardzo wysokiej oceny tej rozprawy.

Rozprawa doktorska mgr Joanny Olszańskiej spełnia warunki określone w Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam wniosek do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Olszańskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie Jej stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w zakresie nauk biologicznych.

Ponadto, zważywszy na wysoką wartość poznawczą i aplikacyjną recenzowanej rozprawy doktorskiej, o czym świadczy również opublikowanie w latach omówionych w rozprawie wyników w postaci dwóch oryginalnych artykułów (jednego pierwszoautorskiego), które już ukazały się w latach 2021-2025 wiodących czasopismach naukowych i dwóch artykułów przeglądowego w tematyce rozprawy (trzy z nich są już cytowane 34 razy; stan na 6 kwietnia 2025 r.) wnioskuję o jej wyróżnienie.

(*Maria Jolanta Rędowicz*)

Signature Not Verified
Dokument podpisany przez Maria Jolanta Rędowicz
Data: 2025.04.07 15:53:20 CEST