Gdańsk, 12 marca 2025

Prof. dr hab. Tomasz Śledziński

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej

Gdański Uniwersytet Medyczny

Dr hab. Małgorzata Janicka, prof. UWr.
Przewodnicząca Rady
Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski

Recenzja pracy doktorskiej mgr. Joanny Olszańskiej pt. „Wzajemne interakcje komórek raka jelita grubego z adipocytami, będącymi elementem niszy nowotworowej".

Praca doktorska mgr. Joanny Olszańskiej ma formę monografii zawierającej typowe elementy tj. streszczenia w języku polskimi angielskim, spis skrótów, wstęp, cel pracy materiały i odczynniki, metody, wyniki, dyskusję, wnioski i bibliografię. Na końcu umieszczono listę publikacji Doktorantki, wśród których jest publikacja oparta na części wyników z pracy doktorskiej w bardzo dobrym czasopiśmie Cell Communication and Signaling (Impact Factor = 8.2). W pracy tej Doktorantka jest pierwszym autorem. Praca doktorska liczy łącznie 171 stron. Jest przygotowana w klarowny sposób i przedstawia bardzo złożone problemy.

Głównym zagadnieniem którego dotyczy praca doktorska jest wzajemna interakcja komórek raka jelita grubego z adipocytami. Obecnie coraz większą uwagę poświęca się komórkom, które są obecne w obrębie guza nowotworowego ale nie są komórkami nowotworowymi. Komórki te tworzą mikrośrodowisko guza nowotworowego i mogą mieć wpływ na wzrost guza oraz tworzenie jego przerzutów. Do komórek tych należą między innymi fibroblasty związane z nowotworem (CAF) oraz adipocyty związane z nowotworem (CAA). Komórki te komunikują się z komórkami nowotworowymi np. poprzez wydzielanie adipokin przez CAA, oraz mogą dostarczać metabolitów, które są następnie wykorzystywane przez komórki nowotworowe w różnych szlakach metabolicznych. Z drugiej strony komórki nowotworu również oddziałują na inne komórki w obrębie guza i zmieniają ich metabolizm. Jest więc to rodzaj wzajemnej interakcji. Stwierdzenie tych zależności otworzyło szerokie pole do badań, które mogą doprowadzić do stworzenia nowych strategii terapeutycznych opartych o wpływ na metabolizm nienowotworowych komórek obecnych w guzie nowotworowym.

Głównym celem ocenianej pracy doktorskiej było zbadanie wzajemnych interakcji pomiędzy komórkami CRC i adipocytami. Te badania można podzielić na dwie części: 1. Wpływ adipocytów na proliferację, migrację i metabolizm komórek nowotworowych i 2. Wpływ komórek CRC na biologię i metabolizm adipocytów, prowadzący do ich przekształcenia w CAA. Ponadto celem pierwszej części badań opisanych w pracy doktorskiej było zbadanie wpływu suplementacji wybranymi kwasami tłuszczowymi (co miało imitować tzw. „tuczenie adipocytów" czyli stan związany z otyłością) na transport i metabolizm lipidów oraz sygnalizację adipocytów.

Badania zostały przeprowadzone w modelu in vitro z użyciem ludzkich pierwotnych hodowli preadipocytów, różnicowanych do adipocytów, oraz mysiej linii fibroblastów 3T3-L1, które również były różnicowane do adipocytów.

Metodyka badań obejmowała hodowlę, różnicowanie i „tuczenie" adipocytów oraz ko-kulturę komórek CRC z adipocytami. W czasie prowadzonych hodowli wykonywano testy na proliferację, migrację i inwazyjność komórek. W materiale pobranym po hodowlach (komórki i media hodowlane) wykonywano następujące badania: a) analiza ekspresji genów na poziomie mRNA (qRT-PCR) i białka (western blotting); b) zymografia żelatynowa; c) badanie rozkładu faz cyklu komórkowego (cytometria przepływowa); d) analiza zawartości lipidów (metoda spektrofotometryczna); e) analiza kropli lipidowych (barwienie cytochemiczne i immunocytochemiczne); f) oznaczanie poziomu mleczanu (metoda enzymatyczna z pomiarem chemiluminescencyjnym). Na wyróżnienie zasługuje czytelne zestawienie użytych materiałów i odczynników w formie tabel.

Najważniejsze wyniki przeprowadzonych badań wg kolejności ich prezentacji w rozprawie to:

1) „Tuczenie" ludzkich adipocytów zwiększało wielkość kropli lipidowych oraz ekspresję transporterów kwasów tłuszczowych.
2) „Tuczenie" ludzkich adipocytów nie wpływało istotnie na ekspresję genów związanych z syntezą lipidów, metabolizmem glukozy i glutaminianu, natomiast obniżało ekspresję niektórych genów związanych z przekształcaniem kwasów tłuszczowych i fosforylację białka sygnałowego Src.
3) Ko-kultura ludzkich komórek CRC z mysimi adipocytami 3T3-L1 prowadzi do przekształcenia tych drugich w CAA, o czym świadczy zmniejszenie zawartości lipidów i obniżona ekspresja genów zaangażowanych w syntezę lipidów oraz genów będących markerami adipocytów.
4) Ko-kultura ludzkich komórek CRC z mysimi adipocytami 3T3-L1 prowadzi do zwiększonego uwalniania mleczanu i metaloproteinazy macierzy 2 (MMP2) w adipocytach.
5) Ko-kultura ludzkich komórek CRC z mysimi adipocytami 3T3-L1 przekształconymi w CAA prowadzi do wzrostu proliferacji, migracji, inwazyjności i zwiększenia kropli lipidowych w komórkach CRC.
6) Ko-kultura ludzkich komórek CRC z mysimi adipocytami 3T3-L1 przekształconymi w CAA prowadzi w komórkach do wzrostu ekspresji transporterów glukozy i obniżenia ekspresji transportera mleczanu, a także powoduje wyższą ekspresją dehydrogenazy mleczanowej A i glutaminazy w komórkach nowotworowych.

Przeprowadzone badania wskazują na istotny wzajemny wpływ ko-kultury adipocytów i komórek CRC na oba typy komórek. Szczególnie istotne jest zwiększenie potencjału proliferacji, migracji i inwazyjności komórek CRC w obecności CAA, co może być spowodowane podażą metabolitów takich jak lipidy czy mleczan przez CAA. Oznacza to, że CAA prawdopodobnie stanowią bardzo ważny element mikrośrodowiska CRC, pozwalający na rozrost guza i tworzenie przerzutów, a tym samym mogą stanowić potencjalny cel nowych strategii terapeutycznych. Ponadto przedstawione wyniki wykazały pewne zmiany

metabolizmu ludzkich adipocytów hodowanych w warunkach imitujących otyłość, co może częściowo tłumaczyć zwiększone ryzyko zachorowania na CRC u osób otyłych. Niestety w dalszych badaniach nad ko-kulturą adipocytów i komórek nowotworowych nie uwzględniono wspomnianego modelu „tuczonych adipocytów".

Badania przedstawione w pracy doktorskiej oceniam jako bardzo aktualne i ważne w kontekście poznawania zmienionego metabolizmu nowotworów. Jak wyżej wspomniałem mogą się one także w przyszłości przyczynić do rozwoju nowych terapii, które są tak potrzebne w obliczu narastającego problemu chorób nowotworowych. Jednakże, mam pewne zastrzeżenia do spójności badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej, wyboru metodyki badania ekspresji genów w poszczególnych doświadczeniach, oraz stwierdziłem stosunkowo dużą liczbę błędów lub niejasnych bądź niefortunnych sformułowań. Problemy te wymieniam poniżej i proszę doktorantkę o ustosunkowanie się do najważniejszych z nich w czasie obrony pracy doktorskiej.

1. Pierwsza moja uwaga dotyczy części badań, których wyniki zostały przedstawione w podrozdziale zatytułowanym „Charakterystyka adipocytów traktowanych kwasami tłuszczowymi". W tej części pracy doktorskiej opisano wyniki badań wskazujące na zmiany metabolizmu ludzkich adipocytów hodowanych w warunkach imitujących otyłość. Ta część badań ma oczywiście ma związek z metabolizmem CRC i może mieć znaczenie w poszukiwaniu molekularnych powiązań otyłości z ryzykiem CRC, ale ponieważ w dalszych badaniach nie prowadzono ko-kultury ludzkich adipocytów z komórkami CRC, uważam że ta część badań jest niespójna z tematem pracy doktorskiej. Po przeczytaniu całej pracy doktorskiej odniosłem wrażenie, że doktorantka planowała kontynuację badań na pierwotnych hodowlach komórek ludzkich w ko-kulturze z komórkami nowotworowymi, lecz z jakiś powodów zrezygnowała z tego planu. Dalsze badania, już związane ściśle z tematem pracy prowadzone są w ko-kulturze ludzkich linii komórek CRC z mysimi adipocytami, a jak sama doktorantka zauważa w rozprawie użycie mysich komórek do kokultury, mimo że taki model był używany również przez innych badaczy niewątpliwie jest ograniczeniem tych badań. Chociażby białka produkowane i wydzielane przez mysie adipocyty różnią się strukturą od białek ludzkich, i niekoniecznie musza oddziaływać na receptory ludzkich komórek CRC. Doktrantka w podsumowaniu pierwszej części wyników napisała że „Z powodu braku znaczących zmian zachodzących pod wpływem traktowania adipocytów solami kwasów tłuszczowych, zaniechano tuczenia adipocytów w kolejnych badaniach". Jednak już na kolejnej stronie znajdziemy podsumowanie wskazujące na istotne zmiany spowodowane „tuczeniem" adipocytów, o których pisałem wcześniej. Proszę o wyjaśnienie czy były jeszcze jakieś inne powody dla których zrezygnowano w dalszych badaniach z modelu ludzkich adipocytów, w tym adipocytów poddawanych „tuczeniu"?

2. Kolejna uwaga dotyczy metody badania ekspresji genów. W pracy badano ją na poziomie mRNA metodą qRT-PCR i na poziomie białka metodą western blotting, jednakże czasem stosowano obie metody a czasem jedną z nich bez uzasadnienia tego wyboru. Przykładowo w badaniach przedstawionych na rycinie 21 użyto tylko metody western blotting, na rycinie 22 część genów była analizowana na tylko na poziomie

mRNA, a na rycinie 23 trzy geny na poziomie mRNA a czwarty na poziomie białka. I podobnie w dalszych wynikach. Oczywiście jeśli białka są regulowane przez fosforylację (jak białka ze szlaków sygnałowych – ryc. 25) uzasadniony jest wybór western blotting. Idealnie jest zbadać ekspresję genów na poziomie mRNA i białka lecz jest to bardzo czasochłonne, jeśli chodzi o badanie western blotting. Z kolei analiza poziomu mRNA pozwala szybko oznaczyć ekspresję wielu genów, a w przypadku dużej części z nich udokumentowano w piśmiennictwie ich regulację na poziomie transkrypcji. Proszę o wyjaśnienie na jakiej podstawie wybierano analizę na poziomie mRNA lub białka.

3. Do badań nad „tuczeniem adipocytów" użyto komórek wyizolowanych z podskórnej tkanki tłuszczowej. Czy w kontekście wpływu adipocytów na komórki CRC nie lepiej było użyć komórek pochodzących z tkanki trzewnej? Z tego co wiem również takie komórki są dostępne komercyjnie.

4. Na stronie 19 rozprawy z zaskoczeniem przeczytałem, że „Zwiększone gromadzenie tłuszczu przez hipertroficzne komórki wynika z zaburzonej równowagi pomiędzy lipolizą (procesem rozkładu trójglicerydów do glicerolu i FA), wychwytem i akumulacją wolnych kwasów tłuszczowych w postaci TG w kroplach lipidowych oraz mitochondrialną lipogenezą de novo (szereg reakcji enzymatycznych prowadzący do syntezy FA z węglowodanów)". Według podręcznikowej wiedzy proces syntezy FA zachodzi w cytozolu a nie w mitochondriach. Istnieją co prawda doniesienia o mitochondrialnej FASN, jednak chyba nie ma ona dużego znaczenia w kontekście akumulacji lipidów w adipocytach. Proszę o wyjaśnienie czy to błąd, czy też doktorantka uważa, że proces syntezy FA w mitochondriach odgrywa ważną rolę w rozwoju otyłości?

5. Na tej samej stronie napisano, że nadekspresja CD36 w adipocytach prowadzi do redukcji otyłości. Jest to zaskakujące, skoro białko CD36 jest odpowiedzialne za transport FA do adipocytów i wydaje się, że zwiększony transport FA do tych komórek powinien prowadzić do większego odkładania lipidów w tkance tłuszczowej. Proszę o komentarz.

6. Na rycinie 3 oraz kolejnych (np. 5 i 8) użyte są symbole opisane w legendzie jako „cząsteczki prozapalne", „cząsteczki przeciwzapalne" i „metabolity". Wymienione grupy związków są na tyle obszerne i niejednorodne jeśli chodzi o budowę, ze należałoby choć w tekście wymienić przykłady. W tekście dotyczącym ryciny 3 znalazłem tylko wzmiankę o prozapalnych adipokinach.

7. Na rycinach 7 i 9 zaznaczono mitochondria i obecny w nich cykl Krebsa (TCA). Jednak takie procesy jak przemiana pirogronianu w acetylo-CoA czy synteza i rozkład ciał ketonowych „uciekły" doktorantce z mitochondriów. Czy to błąd czy celowe przedstawienie tych procesów poza mitochondrium?

8. Na stronie 27 przeczytałem, że CAA przyczyniają się do usztywnienia macierzy pozakomórkowej, przez to sprzyjając ruchliwości komórek. Proszę o krótkie wyjaśnienie w jaki sposób usztywnienie ECM sprzyja tej ruchliwości.

9. Na stronie 29 doktorantka napisała, że „obserwuje się zmniejszoną aktywność kinazy pirogronianowej, wchodzącej w skład kompleksu łączącego glikolizę i cykl kwasów trójkarboksylowych, powiązaną z promocją wzrostu guza". Wydaje mi się że powyższy opis enzymu bardziej odpowiada dehydrogenazie pirogronianowej. O którą z aktywności tu chodziło?

10. Na stronie 31 napisane jest, że „FA są chętnie wykorzystywane przez komórki nowotworowe, ponieważ pozwalają na uzyskanie około dwukrotnie więcej ATP w porównaniu do glukozy". Przybliżony zysk energetyczny z utlenienia glukozy to 36-38 ATP a z utlenienia kwasu palmitynowego to około 130 ATP, a więc różnica jest znacznie większą niż dwukrotna. Czy też autorce chodziło o różnicę w przeliczeniu na masę tych związków?

11. Na rycinie 13 A jest wzór podpisany „sól sodowa kwasu linolowego". Moim zdaniem jest to sól sodowa kwasu oleinowego.

12. Na rycinie 15 o tytule „Schemat reakcji redukcji soli tetrazolowej do pomarańczowego formazanu, katalizowanej przez dehydrogenazę bursztynianową" widać NADH powstający w wyniku działania dehydrogenazy bursztynianowej. Enzym ten jest flawoproteiną i czasie reakcji redukuje FAD do $FADH_2$ a nie NAD do NADH. Proszę o wytłumaczenie na czym dokładnie polegał pomiar proliferacji komórek CRC.

13. W metodyce na stronie 67 wymienione są dwa geny referencyjne użyte w reakcjach PCR. Brak jest jednak uzasadnienia wyboru akurat tych genów.

14. W badaniach przedstawionych na rycinie 23 pokazano poziom białka OSBPL9 jako związanego z metabolizmem estrów steroli w kroplach lipidowych. Większość tych estrów to estry cholesterolu. Czy zdaniem doktorantki nie lepszym wyborem byłoby w tej sytuacji zbadanie acylotransferazy acylo-CoA – cholesterol (ACAT) odpowiedzialnej za syntezę estrów cholesterolu?

15. W podpisie ryciny 23 i w podsumowaniu tej części wyników na stronie 83 można przeczytać o poziomie RNA i białek związanych z metabolizmem FA w tuczonych adipocytach, natomiast w przedstawionych wynikach znalazłem tylko poziom mRNA takich białek.

16. Dlaczego na rycinach 26 i 27 pokazano pomiar spektrofotometryczny ilości lipidów tylko w mono-kulturach adipocytów a nie ma wyników dla ko-kultur?

17. Na stronie 88 można przeczytać, że „Spadek całkowitej zawartości obojętnych lipidów zweryfikowano analizą ilościową za pomocą pomiaru spektrofotometrycznego (Rycina 28B)...". Analiza ilościowa w chemii analitycznej umożliwia poznanie liczbowej wartości w odpowiednich jednostkach miary, np. w gramach, molach itp. Natomiast wynik przedstawiony na rycinie 28B wyrażony jest w % absorbancji względem kontroli. Moim zdaniem taka jednostka nie pozwala nazwać tej analizy ilościową.

18. Dlaczego na rycinie 32 ekspresja FADS1 została zaliczona do procesów wpływających na zawartość lipidów? Gen FADS1 koduje enzym desaturazę delta-5, odpowiedzialną za przemiany wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, na przykład przemanę DGLA w ARA, natomiast nie wydaje mi się aby wpływał on całkowitą zawartość lipidów.

19. Na stronie 124 napisano" Glutaminian może pośredniczyć w biosyntezie mleczanu, gdy jabłczan powstający w TCA z glutaminy, zostanie utleniony do pirogronianu, a następnie w reakcji katalizowanej przez LDHA, ulegnie przekształceniu w mleczan." Glutamina nie jest metabolitem TCA.

20. Na stronie 126 napisano: „Brak różnic w opisanych wyżej poziomach genów i białek związanych z syntezą, modyfikacjami kwasów tłuszczowych, a także ich rozkładem pociąga za sobą brak zmian w aktywacji szlaków sygnalnych." Czy czasem nie jest na odwrót? - Brak zmian w szlakach sygnalizacyjnych powoduje brak zmian ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę i przemiany FA?

Na drobniejsze uwagi zamieszczone poniżej nie ma potrzeby, aby doktorantka odpowiadała w czasie obrony pracy doktorskiej. Zamieściłem je w recenzji ponieważ liczę, że będą pomocne w przygotowywaniu kolejnych opracowań naukowych przez doktorantkę w przyszłości.

21. Na stronie 16 napisano: „...fundamentalnym komórkowym składnikiem tkanki tłuszczowej są adipocyty, które przechowują głównie długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. fatty acid, FA) w postaci kropli lipidowych (ang. lipid droplets, LD)". Należałoby sprecyzować, że w formie triacylogliceroli.

22. Na stronie 18 doktorantka używa zamiennie terminu metaloproteazy i metaloproteinazy, nawet gdy podaje prawidłową nazwę w języku angielskim np. „metaloproteazy macierzy (ang. matrix metalloproteinase, MMP) i tkankowe inhibitory metaloproteinaz (ang. tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)." Częściej używana nazwa to metaloproteinazy.

23. Na stronie 21 napisano, że „Glukoza, po wniknięciu do komórki, zamiast być metabolizowana w procesie glikolizy, może ulegać glikoneogenezie i zostać przekształcona w glikogen...". Powinien tu być użyty termin glikogenogeneza, lub synteza glikogenu.

24. Na stronie 24 użyto karkołomnego terminu: „lipaza trójglicerydów tłuszczowych (ATGL)". TAG ze swojej natury należą do tłuszczy. Proponowałbym nazwę lipaza triacyloglicerolowa adipocytów. Poniżej znalazłem termin „lipaza monoacylogliceryd owa". Proponowałbym lipaza monoacyloglicerolowa tak jak w podanym w nawiasie prawidłowym nazewnictwie anglojęzycznym. Stronę dalej na rycinie 6 znaleźć można trój-, di- i monoglicerydy. Proponowałbym używać nazw monoacyloglicerol, diacyloglicerol i triacyloglicerol. W każdym razie konsekwentnie trzymać się jednej konwencji w całej pracy.

25. Strona 32. Prawidłowa nazwa enzymu to liaza ATP-cytrynianowa a nie liaza cytrynianowa ATP.

26. Rycina 11 jest niezbyt precyzyjna, ponieważ FASN nie wymaga ATP do reakcji. ATP jest zużywane w reakcji katalizowanej przez ACC.

27. W tabeli 11 w pierwszej kolumnie po lewej stronie jest podpis „startery dla adipocytów zróżnicowanych". Nie napisano jednak czy mysich czy ludzkich. Domyślam się tylko, że dla mysich bo kolejne startery są podpisane „startery dla komórek ludzkich".

28. Rozdział 3.7 jest zatytułowany „Pomiar spektrofotometryczny ilości kwasów tłuszczowych w komórkach", podczas gdy tabela 10 ma tytuł: „Odczynniki użyte do ilościowego oznaczenia obojętnych lipidów w komórkach." Opisana metoda służy do pomiaru lipidów obojętnych głównie TAG i taki powinien być tytuł rozdziału 3.7.,

29. Na stronie 97 napisane jest „pożywka DMEM pozbawiona surowicy płodowej". Lepiej napisać „bez dodatku surowicy płodowej", ponieważ pożywka DMEM jako taka nie zawiera tej surowicy.

30. Na stronie 125 napisano: „LPCAT biorą udział w acetylacji fosfatydylocholiny (PC) z lizo-PC w szlaku nazywanym cyklem Landsa" Powinno być acylacji a nie acetylacji.

Podsumowując, praca doktorska mgr Joanny Olszańskiej stanowi znaczący wkład w badania mikrośrodowiska raka jelita grubego i wzajemnych oddziaływań komórek tworzących to mikrośrodowisko, i wyznacza dalsze kierunki badań w tym temacie, które mogą doprowadzić do praktycznego zastosowania tej wiedzy w leczeniu pacjentów. Cześć wyników zawartych w pracy doktorskiej została opublikowana w prestiżowym czasopiśmie Cell Communication and Signaling (Impact Factor = 8.2). Pomimo wymienionych przeze mnie zastrzeżeń, które obniżają ogólną ocenę pracy, uważam, że spełnia ona kryteria stawiane rozprawie doktorskiej określone w aktualnie obowiązujących regulacjach prawnych i oceniam pracę pozytywnie. Wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Joanny Olszańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

Tomasz Skrzypczak