POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY
Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland
Phone: (48-22) 659 85 71; Fax: (48-22) 822 53 42
http://www.nencki.gov.pl

Prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek
Pracownia Neurobiologii Molekularnej
Centrum Neurobiologii CEPT

Warszawa, 16.02.2020

RECENZJA rozprawy doktorskiej

mgr Aldony Olchowskiej–Jarząb pt." Wpływ gastryny i nie amidowanych peptydów gastryny na interakcje miedzy receptorami aktywowanymi przez proliferatory peroksysomów (PPARγ) a mechanizmami karcinogenezy jelitowej i apoptozy w modelach nowotworowych *in vitro*".

Autorka rozprawy podjęła ważny problem naukowy i kliniczny, jakim jest poznanie molekularnych mechanizmów powstawanie raka układu pokarmowego oraz poszukiwanie nowych substancji mogących wywoływać śmierć komórek nowotworowych. Jak to często bywa, dostępne informacje są niepełne i czasami sprzeczne, zwłaszcza, że w przeszłości badano głównie komórki nowotworowe, a obecnie dużą uwagę przypisuje się mikrośrodowisku nowotworu, w którym przebiegają inne procesy. Receptory PPARγ budzą duże zainteresowanie, gdyż ich udział w licznych ważnych procesach (także tych związanych z nowotworzeniem) został dobrze udokumentowany, a dostępność mniej lub bardziej specyficznych inhibitorów pozwala liczyć na przyszłe efekty w klinice.

Celem rozprawy było zbadanie, jaki jest *„Wpływ gastryny i nie amidowanych peptydów gastryny na interakcje miedzy receptorami aktywowanymi przez proliferatory peroksysomów (PPARγ) a mechanizmami karcinogenezy jelitowej i apoptozy w modelach nowotworowych in vitro".*

Sformułowanie celu brzmi bardzo ambitnie i obiecuje znacznie więcej niż zrealizowano w rozprawie. Rozprawa jest zestawem 3 publikacji: dwóch doświadczalnych i jednej pracy przeglądowej poprzedzonych krótkim wstępem. Mgr Aldona Olchowska–Jarząb jest pierwszą autorką tych prac. Rozprawa zawiera wstęp bardzo skrótowo i powierzchownie podaje informacje na temat epidemiologii i etiologii nowotworów układu pokarmowego, przebiegu nowotworzenia i roli apoptozy w tych guzach. Kolejny podrozdział dotyczy krótkiego omówienia szlaku przekaźnictwa i roli receptorów PPAR oraz β-katenina-WNT w nowotworzeniu. Wprowadzenie to jest bardzo skrótowe, oparte głównie o prace przeglądowe i daje tylko bardzo ogólny obraz sytuacji, nie robi też wrażenia, aby autorka była szczególnie kompetentna w tym temacie. Informacje są w zasadzie powielone w pracy przeglądowej. **Nie ma we Wstępie informacji o gastrynie i peptydach, których działanie na komórki jest przedmiotem rozprawy.**

W kolejnych rozdziałach autorka krótko omawia cel i metodykę (2.5 strony), przedstawia bardzo zwięźle na 2 stronach wyniki i kilka wniosków. Główną częścią rozprawy są załączone 2 prace doświadczalne opublikowane w *Clin Diagn Pathol. 2018* i *International Journal of Biological and Pharmaceutical Sciences, 2019*, i jednej pracy przeglądowej o receptorach TLR i PPARγ w nowotworzeniu raka układu pokarmowego opublikowanej w *Folia Medica Cracoviensia 2019*.

Przyznam, że na podstawie krótkich opisów metodyki nie sposób uznać, czy badania były przeprowadzone właściwie, bo brakuje licznych informacji dotyczących warunków hodowli, wyboru stężeń badanych peptydów, opisu procedur Western blot. Cześc tych informacji jest w opublikowanych pracach. Uważam, że podawanie tak skrótowej metodyki mija się z celem, bo niczego nie wyjaśnia i niczemu nie służy, więc lepiej było pozostać przy dołączeniu publikacji, w których metodyka jest dokładniej opisana.

W badaniach zastosowano dwie proste techniki: badanie metabolizmu MTT i badanie poziomu kilku białek metoda Western blot. Jest to zestaw metod dobrych do wykonania pracy magisterskiej, ale zupełnie niewystarczający do przeprowadzenia badań, które powinny stanowić podstawę pracy doktorskiej.

Opis Wyników zawiera się na 1,5 strony i mówi o: 1) o efekcie wzrostowym gastryny i Gly-gastryny na komórki, który wyraźnie zależy od dawki; 2) stwierdzeniu wzrostu poziomu białka PPARγ pod wpływem działania gastryny i Gly-gastryny w komórkach linii PANC-1, oraz wzrost poziomu białka PPARγ w komórkach linii OE-33 pod wpływem gastryny; 3) stwierdzeniu wzrostu poziomu białka β-kateniny pod wpływem działania gastryny i Gly-gastryny w komórkach obu linii, ale nie zaobserwowano aktywności PPARγ.

Sformułowano wnioski, które są częściowo powtórzeniem wyników oraz obejmują sformułowania takie jak:

3. „W linii komórkowej OE-33 zaobserwowano że indukcja białka β-kateniny osłabia aktywność PPARγ.

4. Uzyskane wyniki potwierdzają, że w przypadku części nowotworów przewodu pokarmowego obserwujemy spadek aktywności PPARγ przy jednoczesnym wzroście aktywności szlaku WNT-β-katenina.

5. Wzrost aktywności szlaku WNT-β-katenina sprzyja hamowaniu procesu apoptozy poprzez wzrost ekspresji białka β-kateniny wybranych komórkowych liniach nowotworowych?"

WYNIKI. Opis wyników napisany jest bardzo źle i nieprecyzyjnie: Autorka używa określeń typu" *leczenie komórek prekursorem gastryny Gly-G17*". Pisze o efekcie troficznym (niejasne dlaczego używa takiego określenia?) zależnym od dawki, ale tej zależności nie widać Gly-gastryna zwiększa liczbę aktywnych komórek o 25% tylko podana w stężeniu 10^{-5} M, a gastryna w 2 stężeniach o 25-50%. W publikacji 1 w fig.1 górny panel jest ucięty, więc nie wiemy co tam jest. W kolejnej figurach 3-4 pokazano poziomy PPARγ i β-kateniny oraz densytometrię blotów.

Nie wiadomo skąd wniosek: *„Uzyskane wyniki potwierdzają, że w przypadku części nowotworów przewodu pokarmowego obserwujemy spadek aktywności PPARγ przy jednoczesnym wzroście aktywności szlaku WNT-β-katenina".* Poziom białka PPARγ nie spada tylko rośnie po gastrynie i Gly-gastrynie w jednej linii, a w drugiej pozostaje na tym samym poziomie.

W drugiej pracy pokazano, że ciglitazone w stężeniu 10 i 20 μM w jednej linii zwiększa liczbę aktywnych komórek, w drugiej obniża. Towarzyszyły temu niewielkie wzrosty poziomu PPARγ, P-

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY
Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland
Phone: (48-22) 659 85 71; Fax: (48-22) 822 53 42
http://www.nencki.gov.pl

AKT i BCL-2 w obu liniach podobne, czyli nie było żadnej korelacji między tymi wypadkami. Autorka pisze w tej publikacji *„Our reserach has shown that ciglitazone increases PPARγ activity and affects apoptosis"*. **Te wnioski są nieuprawnione: nie badano apoptozy, więc nie można tak powiedzieć. Zmiana liczby aktywnych komórek może być wynikiem spadku proliferacji. Ponadto w obu liniach był wzrost białka PPARγ, P-AKT i BCL2 w tym samym czasie, ale wpływ na komórki był różny, czyli nie ma związku między obserwowanymi zmianami.**

Kolejna praca załączona do rozprawy dotyczy roli receptorów TLR i PPARγ w powstawania raka układu pokarmowego i została opublikowana w Folia Medica Cracoviensia 2010. Jest to słaby przegląd danych o mechanizmach powstawania raka układu pokarmowego i trochę bardziej szczegółowy przegląd wiedzy o udziale receptorów TLR i PPARγ w tym procesie.

Badania prezentowane w rozprawie zostały przeprowadzone za pomocą niewielkiego zestawu metod: badanie wpływu różnych związków na komórki 2 komercyjnych linii wyprowadzonych z raka jelita za pomocą testu metabolizmu MTT oraz analizę poziomu kilku białek. Biorąc pod uwagę ograniczone spektrum przeprowadzonych badań i fakt, że zestaw wyników prezentowanych w 2 pracach uzyskano za pomocą tylko 2 prostych metod przy braku zastosowania właściwych metod do pomiaru aktywności białek (zbadano tylko ich poziom) czy też apoptozy (nie zbadano tego wcale), przedstawione wnioski należy uznać za nieuzasadnione. Autorka pisze nieprecyzyjnie, że wyniki pokazują wzrost aktywności szlaku WNT-β-katenina, podczas gdy pokazuje tylko niewielkie zmiany poziomu białka, co nie jest tożsame z aktywnością białka czy szlaku. Aktywność powinno się zbadać innymi metodami.

Na pewno nie można na podstawie tych wyników pisać o interakcjach z aktywnością czy przekaźnictwem PPARγ a szlakiem WNT-β-kateniny i wyciągać bardziej ogólnych wniosków. Zaprezentowane wyniki są niekompletne i nieprzekonujące, a wnioski są spekulacjami, bez realnej podstawy w wynikach. Zdumienie budzi fakt, że te wyniki zostały opublikowane nawet w takich słabych czasopismach. Prace w *Clin Diagn Pathol. 2018* i *International Journal of Biological and Pharmaceutical Sciences, 2019* są niezręcznie napisane, a dyskusja czysto spekulatywna. Praca są źle napisane, pełne błędów językowych i ogólnikowych, czasem niezrozumiałych stwierdzeń, np. cytuję z abstraktu: *„The results obtained reflect the trend in the publication"*. Dziwi mnie, że takie prace zostały opublikowane, gdyż metodycznie i interpretacyjnie budzą wątpliwości.

Tytuł pracy *„Wpływ gastryny i nie amidowanych peptydów gastryny na interakcje miedzy receptorami aktywowanymi przez proliferatory peroksysomów (PPARγ) a mechanizmami karcinogenezy jelitowej i apoptozy w modelach nowotworowych in vitro"* nie odpowiada treści rozprawy. Prezentowane wyniki oparte są o fragmentaryczne, czysto korelatywne dane i nie mówią nic o interakcjach miedzy wspomnianymi procesami. Takie wyniki przynoszą więcej szkody niż pożytku i nie poszerzają znacząco naszej wiedzy.

Przy ocenie uzyskanych wyników nasunęło mi się ponadto kilka zastrzeżeń:

1. Uważam, że niewłaściwe jest pisanie o prowadzeniu badań w modelach in vitro nowotworów przewodu pokarmowego. Nowotwór składa się nie tylko z komórek nowotworowych, ale też mikrośrodowiska, którego specyficzne cechy: nacieki komórek układu odpornościowego, angiogeneza, reakcja fibroblastów, systemowa odpowiedź przeciwnowotworowa, determinują rozwój guza i odpowiedź na leczenie. Badania na liniach komórkowych, choć pożyteczne, wyjaśniają zaburzenia w komórkach nowotworowych, niekoniecznie w całym nowotworze i nie są modelem nowotworu (modelami mogą być modele zwierzęce czy organoidy). Autorka badała wybrane elementy przekaźnictwa i działania substancji czynnych w komórkach nowotworowych wyprowadzonych z nowotworów przewodu pokarmowego i tylko tak powinna określić zakres swoich badań.
2. Autorka popełnia częsty błąd kiedy pisze, że „za pomocą testu MTT badano tempo proliferacji". Mimo iż opisuje, na czym polega test metabolizmu MTT i pisze, że mierzy on aktywność mitochondriów i określa liczbę żywych komórek.
3. Praca jest dość niestarannie napisana. Autorka popełnia skróty myślowe i wraża się nieprecyzyjnie, np. w streszczeniu pisze "badano efekty troficzny działania gastryny ... na wybrane linie komórkowe...przy pomocy testu MTT". Dlaczego nazywa to efektem troficznym? Badano wpływ na komórki , a nie na linie komórkowe. Powinno być też za pomocą testu metabolizmu MTT. Pisanie „ma wpływ białko β-kateninę oraz aktywność receptorów PPARγ" też nie jest precyzyjne, gdyż powinno być powiedziane, jaki jest ten wpływ: aktywujący, hamujący etc..
4. Nie powinno się używać określeń typu: „śmierć nowotworowa"; „procesy mutacyjne" (chodzi o mutacje lub inne zmiany genetyczne np. amplifikacje, translokacje itp., o czym autorka nie pisze); „śluzówkową produkcję cytokin";

   APC, DCC – te skróty powinny być rozwinięte przy pierwszym użyciu słowa i wykazane z wykazie.

   Niezręczne i nieprecyzyjne jest pisanie: " unieczynnienie genów o charakterze mutatorowym (naprawczym)". Poprawne jest: Dziedziczny rak jelita grubego jest najczęściej związany z zespołem Lyncha, w którym występują uszkodzenia genów związanych z naprawą uszkodzeń DNA (*MLH1, MSH2, PMS2, MSH6*). Jest sporo błędów edytorskich, literówki, brak przecinków etc. Co to jest cyktlitazon? Czy chodzi o Ciglitazon? Są błędy merytoryczne: *IAP to skrót od 'inhibitors of apoptosis',* a nie bindig protein with low pI. Zdarzają się literówki wypaczające sens: str. 13. „w rejonach paromotorowych".
5. Nazwy genów powinny być napisane kursywą.

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY
Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland
Phone: (48-22) 659 85 71; Fax: (48-22) 822 53 42
http://www.nencki.gov.pl

Reasumując, mam duży problem z oceną tej pracy zarówno ze względu na jej nietypową formę jak i zawartość merytoryczną, a zwłaszcza wyprowadzone wnioski, które uważam za nieuzasadnione. Ogólnie oceniam przedstawioną mi do oceny pracę jako bardzo słabą, zawierającą nieliczne wyniki, słabo udokumentowane, bardzo prostymi metodami, nieadekwatnymi do celów sformułowanych przez autorkę. Zawartość merytoryczna jest na poziomie przyzwoitej pracy magisterskiej. Doktorantce nie do końca powiodło się realizowanie ambitnego celu badawczego, gdyż użyto nie do końca odpowiednich metod, a wyniki nie pozwalają na takie wnioski, jakie sformułowała. Uzyskane wyniki nie są na poziomie pracy doktorskiej, a sam fakt ich opublikowania w czasopismach o żadnym lub niskim impact factor (z kategorii predatory journals) nie poprawia sytuacji.
Rozprawa nie świadczy o dobrym przygotowaniu doktorantki do prowadzenia badań, wskazuje na powierzchowną znajomość literatury przedmiotu i brak staranności w planowaniu doświadczeń i ich interpretacji. Publikowanie takich wyników i interpretacji przynosi nauce więcej szkody niż pożytku.

Uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorskiej **mgr Aldony Olchowskiej–Jarząb pt." Wpływ gastryny i nie amidowanych peptydów gastryny na interakcje miedzy receptorami aktywowanymi przez proliferatory peroksysomów (PPARγ) a mechanizmami karcinogenezy jelitowej i apoptozy w modelach nowotworowych *in vitro*"**
z trudem spełnia wymagania ustawy stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora nauk biologicznych i wnioskuję do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego-Collegium Medicum i wnioskuje o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

Prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek