

dr hab. Ewa Stelmańska
Katedra i Zakład Biochemii
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

Gdańsk, 26 maja 2023 r

Tel: 58 349 1478
Fax: 58 349 1460
email: ewa.stelmanska@gumed.edu.pl

dr hab. Katarzyna Sierakowska, prof. UMK
Przewodnicząca Rady Dyscypliny Nauki
Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika
Rydgiera w Bydgoszczy.

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Marleny Budek** pt. „*Ocena zależności między melatoniną, sekrecją wybranych adipokin, a wykładnikami stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w przebiegu nowotworów neuroendokrynnych. Nowe, potencjalne markery diagnostyczne.*”

Temat przesłanej do oceny rozprawy doktorskiej jest aktualny i ważny nie tylko ze względów poznawczych, ale przede wszystkim praktycznych. Doktorantka podjęła się bardzo ambitnego i ważnego w aspekcie klinicznym celu zidentyfikowania małoinwazyjnych, nowych markerów diagnostycznych dla nowotworów neuroendokrynnych (NENs). Temat ten jest bardzo istotny, ponieważ nowotwory te stanowią duży problem diagnostyczny, ze względu na brak charakterystycznych objawów oraz swoistych markerów pomocnych w rozpoznaniu, a często są rozpoznawane za późno, gdy choroba jest już bardzo zaawansowana. Dążąc do realizacji głównego celu, Pani Marlena Budek oznaczyła we krwi pacjentów z różnymi nowotworami neuroendokrynnymi ponad 60 parametrów związanych ze stresem oksydacyjnym, aktywnością endokrynną tkanki tłuszczowej oraz stanem zapalnym. Wyniki swojej pracy, które stanowią kontynuację ważnych badań zespołu promotora rozprawy – Pani profesor dr hab. Karoliny Szewczyk – Golec, Doktorantka przedstawiła w obszernej monografii naukowej. Warto podkreślić, że nie jest to jedyna dokumentacja wykonanych doświadczeń. Pani Marlena Budek jest współautorem dwóch dzieł naukowych opublikowanych w ubiegłym roku w dwóch różnych czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Przedstawiona do recenzji monografia naukowa ma układ klasyczny i jest bardzo obszerna. Rozprawa zawiera 238 stron i składa się z następujących głównych rozdziałów: *Wstęp, Cel Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Spis Tabel, Spis Rycin oraz Piśmiennictwo* (zawierające 686 pozycji). Do pracy dołączono również Zgodę Komisji Bioetycznej, stanowiącej ostatni rozdział. Przed zasadniczą częścią monografii Doktorantka zamieściła Wykaz skrótów, który został przygotowany starannie i poprawnie.

Wstęp, składający się z kilku podrozdziałów, stanowi wyczerpujące kompendium wiedzy związane z tematem rozprawy. Przedstawiono w nim charakterystykę, diagnostykę i leczenie nowotworów neuroendokrynych, scharakteryzowano stan zapalny i jego rolę w kancerogenezie, opisano stres oksydacyjny i antyoksydacyjną funkcję melatoniny oraz przedstawiono endokrynną funkcję tkanki tłuszczowej. W mojej ocenie ta część rozprawy doktorskiej napisana jest bardzo dobrze i wyczerpująco. Muszę jednak, ze względu na rolę recenzenta, zwrócić uwagę na parę drobnych błędów i nieścisłości, które znalazły się w tym fragmencie rozprawy doktorskiej.

1. Na str. 15 znajduje się zdanie: „*NENs uwalniają do krążenia ok. 40 rodzajów biologicznie czynnych amin i peptydów, wśród których wyróżnia się histaminę, kalikreinę, prostaglandyny, tachykininy, a za większość cech klinicznych odpowiada serotonina, będąca metabolitem tryptofanu.*” W zdaniu tym wkraść się mały błąd merytoryczny, ponieważ prostaglandyny nie są aminami lub peptydami, lecz eikozanoidami - pochodnymi wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Również LTA4 nie jest lipoksyną, jak napisała Doktorantka (str. 36), tylko leukotrienem.

2. Niejasny jest zapis wartości procentowej na str 15: „... , iż 30-7% pacjentów ma przerzuty w momencie rozpoznania.”

3. Uważam, że wyrażenie: „*białko ulega ekspresji*” jest trochę niefortunne, ponieważ powszechnie w pracach naukowych słowo ekspresja używa się w odniesieniu do genu. W odniesieniu do białka używa się słów takich jak: stężenie, występowanie, gęstość czy poziom. Sugerowałabym również, aby w przyszłości używać słowa mikrobiom zamiast flora bakteryjna (str. 44). Sformułowanie: „...zmniejszając wrażliwość cykazy adenylanowej...” jest również nie jasne. Czy chodziło o aktywność tego enzymu czy jego wrażliwość na jakiś związek, który nie został dopisany?

4. We wstępie na str. 48 Doktorantka napisała: „ ...dochodzi do indukcji COX2 indukowanej przez NOS...”. Bardzo proszę o wyjaśnienie, czy jest to skrót myślowy, czy enzym indukuje enzym, czy chodziło o tlenek azotu czy jest to literówka i chodziło o ROS. Nie zrozumiałe jest dla mnie stwierdzenie na str. 25 : „...podjednostka alfa hCG wspólna dla wszystkich hormonów glikoproteinowych...” Czy na pewno wszystkie hormony glikoproteinowe mają podjednostkę alfa hCG?

5. Doktorantka napisała również, że „hiperplazja adipocytów jest procesem nieodwracalnym”. Bardzo proszę o ustosunkowanie się do tego zdania, ponieważ z badań histologicznych wiemy, że ludzkie adipocyty żyją około 10 lat, a nowe komórki powstają z preadipocytów, komórek macierzystych obecnych w tkance tłuszczowej.

Chciałam jednak podkreślić, że powyższe uwagi są naprawdę mało istotne, szczególnie jeżeli weźmiemy pod uwagę obszerność wstępu napisanego przez Doktorantkę. Rozdział ten (podobnie jak cała monografia) jest napisany bardzo dobrze, zawiera aktualny stan wiedzy opisanych tematów i prawidłowo dobrane piśmiennictwo. Chciałabym również pochwalić Doktorantkę za bardzo dobrze opracowane tabele, które systematyzują informacje i ułatwiają czytanie pracy.

W kolejnej części rozprawy Doktorantka w sposób jasny i zrozumiały przedstawiła założenia i cele pracy, których realizację konsekwentnie przedstawiła w następnych rozdziałach.

Muszę jednak dodać, że w tej części monografii znalazły się dwa zdania, których konstrukcja jest błędna:

1. „Ze względu na fakt, że zagadnienia związane ze stresem oksydacyjnym, stanem zapalnym i funkcją endokrynną tkanki tłuszczowej nie są dostatecznie zgłębione w przebiegu NENs, a także brakuje miarodajnych biomarkerów pozwalających na łatwiejszą diagnostykę NENs o różnej lokalizacji, specyficznych dla choroby”. Brakuje drugiej części zdania.

2. W pierwszym „celu„ brakuje określenia na co badany będzie wpływ stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego, regulacji metabolizmu węglowodanów i funkcji endokrynną tkanki tłuszczowej.

Biorąc pod uwagę metodykę pracy, Doktorantka może pochwalić się z jednej strony znajomością metod oznaczeń aktywności kilku enzymów, takich jak katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationu, a z drugiej strony biegłością oznaczania stężeń wielu związków głównie w oparciu o metodę ELISA i metody fluorescencyjne z użyciem immunologicznych zestawów Bio-Plex. Opis metodyczny jest wyczerpujący i poprawny.

Również wyniki badań, zarówno ryciny jak i ich opisy są przedstawione rzetelnie i czytelnie. Badaniem objęto 86 pacjentów z rozpoznaniem nowotworów neuroendokrynnych, których podzielono ze względu na lokalizację guza na cztery grupy (guz trzustki, przewodu pokarmowego, płuca oraz grupa guzów o innej lokalizacji). Grupę kontrolną stanowiło natomiast 35 osób zdrowych, które niestety zarówno pod względem BMI, jak i wieku oraz wzrostu istotnie odbiegały od parametrów grupy badanej. Mogło to mieć wpływ szczególnie na obserwowane różnice w stężeniu adipokin. Jednak dobór odpowiedniej grupy kontrolnej w tym wypadku nie był łatwy, choć szkoda, że nie udało się zebrać dodatkowej grupy kontrolnej o podobnym, jak w grupie badanej, BMI. Doktorantka zbadała, przeanalizowała i porównała imponującą ilość parametrów, bo aż ponad 60. Zastosowała prawidłowe metody statystyczne i analizy krzywych ROC. Uzyskane przez młodego naukowca wyniki są konfrontowane w rozdziale *Dyskusja* z wcześniej publikowanymi doniesieniami naukowymi, bogato cytowanymi w dołączonym obszernym wykazie literatury. To świadczy o wnikliwym zgłębieniu tematu badań podjętego przez Doktorantkę. Mam tylko jedno pytanie odnośnie zdania znajdującego się na stronie 133. Doktorantka napisała: „*NADPH jest głównym źródłem wewnątrzkomórkowych ROS w komórkach raka trzustki, głównie $O_2^{\cdot-}$*” Bardzo proszę o wytłumaczenie, co Doktorantka dokładnie miała na myśli i czy nie jest to przypadkiem błędne sformułowanie. Powszechnie bowiem wiadomo, że NADPH jest potrzebny do redukcji utlenionego glutationu, co jest ważnym etapem w mechanizmie obronny komórki przed działaniem nadtlenu wodoru, silnym utleniaczem powodującym uszkodzenie komórek.

W kolejnym rozdziale recenzowanej rozprawy Doktorantka podsumowała wyniki swojej pracy i przedstawiła wnioski. Są one prawidłowo sformułowane i w całej pełni udokumentowane wynikami przeprowadzonych doświadczeń. Przedstawione pod koniec rozprawy *Streszczenie* napisane w języku polskim i angielskim, jasno i zwięźle obrazuje cele i najważniejsze wyniki pracy. Doktorantka wykazała iż w przebiegu nowotworów neuroendokrynnych występuje szereg zaburzeń związanych ze zmianą równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej, aktywacją stanu zapalnego oraz wydzielaniem adipokin przez tkankę tłuszczową. Zaobserwowała nasiloną peroksydację lipidów, zaburzenie enzymatycznej obrony antyoksydacyjnej oraz znaczne niedobory melatoniny u pacjentów z nowotworami neuroendokrynnymi. Młoda badaczka wykazała, że w przebiegu nowotworów neuroendokrynnych dochodzi do istotnego zaburzenia gospodarki węglowodanowej, o czym świadczy zmiana parametrów diabetologicznych (takich jak insulina, GIP, glukagon, inhibitor aktywatora plazminogenu 1) oraz w profilu uwalnianych adipokin

(wisfatyny, leptyny, omentyny 1, rezystyny). Nasuwa się pytanie dlaczego Doktorantka nie zmierzyła stężenia adiponektyny? Jest to obok leptyny jedna z najlepiej poznanych adipokin, która ma wpływ na gospodarkę lipidową i węglowodanową człowieka. Doktorantka wykazała i częściowo potwierdziła, że w przypadku nowotworów neuroendokrynych dochodzi do zaburzenia wydzielania wielu cytokin, chemokin i czynników troficznych, zarówno prozapalnych i proangiogennych, jak i przeciwzapalnych i przeciwangiogennych, przy czym wzorzec i nasilenie tych zmian były odmienne dla nowotworów o różnej lokalizacji. Najważniejsze jednak jest to, że badania Doktorantki doprowadziły do wskazania nowych parametrów, które mogłyby znaleźć potencjalne zastosowanie jako małoinwazyjne markery w procesie diagnostycznym, rokowniczym, czy też terapeutycznym nowotworów neuroendokrynych. Nie udało się wyodrębnić swoistego markera, jednak Doktorantka wykazała, że jednoczesne oznaczanie kilku parametrów takich jak: chromogranina A, GPx, GLP-1, M-CSF, GM-CSF, SCGF- β , HGF, GRO- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-2R α , IL-5, IL-9, IP-10, MIP-1 β , TNF- β , glukagon, leptyna, wisfatyna lub omentyna-1 może usprawnić diagnostykę nowotworów neuroendokrynych. Ponadto młoda badaczka wyznaczyła wzór predykcji dla nowotworów neuroendokrynych z zastosowaniem oznaczania stężenia GRO- α i TNF- β , który pozwala na określenie prawdopodobieństwa potwierdzenia lub wykluczenia nowotworów neuroendokrynych z dokładnością 94,5%.

Na zakończenie dodam, że rozprawę doktorską mgr Marleny Budek uważam za bardzo ważną pracę badawczą, która może mieć istotne znaczenie w diagnostyce nowotworów neuroendokrynych. Autorka nie ustrzegła się kilku literówek, które nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

W podsumowaniu stwierdzam, że mgr Marlena Budek jest w pełni ukształtowanym pracownikiem naukowym, posiadającym dobry warsztat doświadczalny, szeroką wiedzę teoretyczną, zdolnym do samodzielnego rozwiązywania skomplikowanych problemów badawczych. Jej rozprawa doktorska została prawidłowo zaplanowana i właściwie przeprowadzona pod względem metodycznym oraz stanowi oryginalny wkład Doktorantki w wiedzę o biologii i diagnostyce nowotworów neuroendokrynych. Stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) i wnoszę o dopuszczenie mgr Marleny Budek do kolejnych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydgiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Marleny Budek.

z poważaniem

Ewa Stelmańska

dr hab. n. med. Ewa Stelmańska

dr hab. Ewa Stelmańska
Gdański Uniwersytet Medyczny