

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Szymona Grochansa

pt.: „EKSPRESJA CHEMOKINY CCL18 ORAZ JEJ RECEPTORÓW CCR8 i PITPNM3 W GLEJAKU WIELOPOSTACIOWYM. ZNACZENIE W PROCESIE NOWOTWORZENIA”

Podstawą niniejszej recenzji jest rozprawa doktorska lek. Pana Szymona Grochansa, wykonana w Zakładzie Biochemii Katedry Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. n. med. Ireny Baranowskiej-Bosiackiej oraz Pani dr n. zdr. Anny Cybulskiej, pełniącej funkcję promotora pomocniczego. Przewodnym tematem przedłożonej do oceny dysertacji jest określenie udziału chemokiny CCL18 i jej receptorów CCR8 i PITPNM3 w procesie nowotworzenia w glejaku wielopostaciowym.

Guzy pierwotne mózgu stanowią do 2% wszystkich nowotworów złośliwych. Spośród nich najczęstszym jest glejak wielopostaciowy (GBM). Wywodzący się z linii astrocytarnej, glejak wielopostaciowy jest jednym z najbardziej agresywnych i złośliwych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. W zależności od analizowanego źródła, szacuje się, że rocznie zapada na niego średnio 4 na 100 000 osób. Rokowanie u chorych na GBM pozostaje złe i wciąż stanowi istotny problem kliniczny. Mimo postępu, jaki dokonał się w ostatnich latach w dziedzinie onkologii, wyniki leczenia złośliwych nowotworów mózgu pozostają niezadawalające, stanowiąc jedno z najważniejszych wyzwań dla współczesnej medycyny i nauki. Pomimo licznie prowadzonych badań dotyczących GBM oraz wpływu chemokin na onkogenezę, niewiele wiadomo o interakcjach między komórkami guza z komórkami podścieliska oraz komórkami immunologicznymi. Aktualnie, jest to jeden z wiodących kierunków badań nad GBM. Szczególnie interesujące wydają się indukowane przez komórki nowotworowe zmiany w ekspresji cytokin chemotaktycznych, wytwarzanych przez komórki związane z rakiem, np. przez makrofagi związane z nowotworem (TAM), limfocyty infiltrujące nowotwór (TIL), komórki supresyjne pochodzące z linii mieloidalnej (MDSC), jak również fibroblasty związane z rakiem (CAF). Dyshomeostaza w stężeniu chemokin może mieć działanie proonkogenne, stymulując angiogenezę, migrację, inwazję, przerzutowanie komórek nowotworu oraz rekrutowanie komórek związanych z nowotworem (TAC) do ogniska guza. Zrozumienie tych wzajemnych relacji z jednoczesnym uwzględnieniem specyficznych warunków panujących w obrębie guza nowotworowego (tj.: hipoksja, stres oksydacyjny, stan niedoboru składników odżywczych) może prowadzić do lepszego zrozumienia molekularnych mechanizmów leżących u podstaw onkogenezy, tym samym umożliwiając opracowanie nowych, skutecznych terapii i potencjalnych leków.

Mając na uwadze powyższe dane, zasadnym jest podjęte przez Doktoranta zagadnienie dotyczące roli chemokin i ich receptorów w interakcji komórek GMB z komórkami związanymi z nowotworem w warunkach panujących w guzie. Szczegółowe cele postawione przez Doktoranta, obejmujące min.: określenie udziału chemokiny CCL18 i jej receptorów CCR8 i PITPNM3 w procesie nowotworzenia w GMB; określenie wpływu mikrośrodowiska guza (hipoksji) na proces nowotworzenia; określenie wpływu płci chorych na progresję nowotworu, przegląd epidemiologii GMB, jak również ocena czynników ryzyka i czynników ochronnych zachorowania na GMB, decydują o nowatorskim charakterze badań jak również o ich wysokim walorze poznawczym i aplikacyjnym. Na uwagę zasługuje informacja, iż przedłożona do oceny dysertacja jest pierwszą, w której analizowano ekspresję receptorów dla CCL18: PITPNM3 i CCR8 w GBM, w warunkach hipoksji.

Ponieważ podjęta przez Doktoranta tematyka badawcza, jak również wyniki przeprowadzonych badań zostały zawarte w cyklu opublikowanych już artykułów, na który składają się 2 prace przeglądowe: „*Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature*” opublikowana w *Cancers* 2022 oraz „*CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of Receptors CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, and CCR10 Ligands*” opublikowana w *IJMS* 2020, jak również 1 praca badawcza: „*CCL18 Expression Is Higher in a Glioblastoma Multiforme Tumor than in the Peritumoral Area and Causes the Migration of Tumor Cells Sensitized by Hypoxia*” opublikowana w *IJMS* 2022; przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest w przeważającej mierze syntetycznym streszczeniem oraz podsumowaniem i omówieniem informacji i wyników prezentowanych w wyżej wspomnianych pracach. Publikacje te są załącznikami w przedstawionej rozprawie i stanowią cykl tematycznie spójnych prac.

Przedstawiona do oceny Rozprawa ma typowy układ, na który składają się: wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, omówienie publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz obszerne piśmiennictwo, liczące 351 pozycji literaturowych. Całość (nie licząc załączonych publikacji) liczy 104 strony. Pomiędzy poszczególnymi częściami pracy zostały zachowane właściwe proporcje.

Tematyka pracy doktorskiej jest bardzo aktualna a tytuł sformułowany został jasno i precyzyjnie; odpowiada w pełni tematyce przedstawionych badań.

Wstęp napisany jest zwięźle i rzeczowo, wprowadzając czytelnika w złożoność analizowanego zagadnienia oraz przedstawiając zasadność wybranej tematyki. We wstępie Doktorant dokonuje charakterystyki glejaka wielopostaciowego, przedstawia klasyfikację glejaków w oparciu o ocenę stopnia ich złośliwości, jak również aktualne postępowanie medyczne w terapii chorych na GBM. Opisuje w nim również złożoność mikrośrodowiska guza nowotworowego, obejmującego wiele typów komórek (TAM, DC, limfocyty T, NK, MDSC, komórki tuczne) o znamiennej roli w progresji nowotworu.

Przesłanki do podjęcia badań, jak również główne założenia i cel pracy, obejmujący czteropunktowe cele szczegółowe zostały jasno i precyzyjnie sformułowane.

Rozdział „Materiał i Metody” zawiera dokładny opis zastosowanego modelu badawczego i wykorzystanego do badań materiału, który stanowiły guzy nowotworowe pobrane od 28 pacjentów (16 mężczyzn i 12 kobiet) ze zdiagnozowanym GMB. W badaniach obrazowych możliwe było wydzielenie i pobranie do badań 3 stref morfologicznych guza: rdzeń guza, rozrastającą się strefę guza oraz strefę okółoguzową, która stanowiła kontrolę w przeprowadzonych badaniach. Ponadto, do badań wykorzystano linię komórkową ludzkich komórek glejaka (U-87 MG) oraz medyczne bazy danych w wersji elektronicznej. Zarówno charakterystyka materiału do badań, zastosowana metodyka badań *in vitro* przeprowadzonych celem przeanalizowania wpływu hipoksji i niedoboru składników odżywczych na ekspresję genów *CCL18*, *CCR8* i *PITPNM3*, zastosowana metodyka badania proliferacji, konfluencji i migracji komórek, metodyka immunohistochemiczna, jak również sposób oceny ekspresji badanych genów w analizowanym materiale oraz statystyczne opracowanie wyników nie budzą zastrzeżeń. Metody badawcze zastosowane przez Doktoranta są właściwe i nowoczesne a zastosowane testy statystyczne gwarantują prawidłowe wnioskowanie statystyczne. Cała metodologia i uzyskanie wyników wskazują na staranność przeprowadzonych badań.

Rozdział „Omówienie publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej” jest przedstawiony w formie trzech podrozdziałów (4.1, 4.2 oraz 4.3), odpowiadających trzem publikacjom Doktoranta. Bardzo szczegółowy przegląd obszernej i wartościowej literatury przedmiotu, wnikliwa i bardzo dokładna analiza kluczowych zmian molekularnych wyzwalających GBM, dociekliwa charakterystyka markerów molekularnych, niosących informacje prognostyczne, predykcyjne, ułatwiający różnicowanie poszczególnych typów nowotworów, a także wnikliwa analiza czynników wpływających na zachorowalność i progresję glejaka wielopostaciowego przedstawiona w pracy przeglądowej pt.: „*Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature*” dowodzi bardzo dobrej znajomości podjętej przez Doktoranta tematyki badawczej, jak również znajomości aktualnego stanu wiedzy, dotyczącego analizowanego przez Doktoranta zagadnienia. Przeprowadzona przez Doktoranta wnikliwa analiza danych potwierdza, że GBM jest najbardziej złośliwym pierwotnym guzem mózgu, który zdecydowanie częściej występuje u mężczyzn i osób otyłych. Ryzyko zachorowania na GBM zwiększa się wraz z wiekiem i wzrostem. Pomimo niepokojącego trendu dotyczącego zachorowalności na GBM, niestety w dalszym ciągu trudno bezpośrednio ustalić przyczyny jego występowania. Niestety, ze względu na znaczące różnice w metodologii raportów epidemiologicznych, dostępne dane nie pozwalają jednoznacznie określić, jaki wpływ na rozwój glejaka ma na przykład stosowanie używek, niektórych leków (np. NLPZ), stosowanie telefonów komórkowych czy narażenie na metale ciężkie; wskazując na konieczność prowadzenia dalszych badań w tym zakresie. Godnym uwagi i rozważenia byłoby również utworzenie międzynarodowego rejestru nowotworów w celu wiarygodnego dokumentowania kluczowych danych dotyczących GBM.

Kolejna praca przeglądowa pt.: „*CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of Receptors CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, and CCR10 Ligands*” to obszerne i niezwykle wartościowe kompendium wiedzy, dotyczące dualistycznej funkcji chemotaktycznych cytokin - chemokin CC znanych, jako ligandy receptorów chemokin z motywem CC (CCR). W tym przeglądzie Doktorant omawia ludzkie chemokiny o motywach CC: CCL1, CCL3, CCL4, CCL5, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21,

CCL25, CCL27 i CCL28 (ligandy receptorów chemokin z motywem CC CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9 i ligandy CCR10). W niezwykle wnikliwy sposób przedstawia ich funkcjonowanie w fizjologii człowieka jak i w nowotworzeniu, w tym ich rolę w proliferacji, oporności na apoptozę, lekooporności, migracji i inwazji komórek nowotworowych. Ponadto Doktorant omawia znaczenie receptorów chemokin z motywem CC w przerzutach specyficznych dla narządu, a także wpływ każdej chemokiny na rekrutację różnych komórek do niszy nowotworowej, takich jak fibroblasty związane z rakiem (CAF), komórki Kupffera, komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego (MDSC), osteoklasty, makrofagi związane z nowotworem (TAM), limfocyty naciekające nowotwór (TIL) i limfocyty T regulatorowe (Treg). Na koniec Doktorant wskazuje, w jaki sposób oddziaływanie chemokin na komórki śródbłonna naczyniowego i limfatycznego może prowadzić do angiogenezy i limfangiogenezy. Powyższe zagadnienia Doktorant analizuje wręcz z biochemiczną dokładnością, co świadczy o znakomitej znajomości analizowanego przez Doktoranta zagadnienia badawczego a także dowodzi niezwyklej dojrzałości naukowej Doktoranta. Jest to moim zdaniem, bardzo duża wartość pracy, jednak zmusza czytelnika do znacznego skupienia by nie zblądzić w zawiłościach biochemicznej sieci sygnalizacyjnej komórki. Bardzo szczegółowy przegląd piśmiennictwa, wnikliwa i bardzo dokładna charakterystyka ścieżek sygnalizacyjnych, molekularnych i biochemicznych mechanizmów decydujących o przeciwnowotworowym i pronowotworowym działaniu chemokin z motywem CC to niezwykle cenne i wartościowe opracowanie, godne polecenia. Wiedza na temat dualistycznej natury działania poszczególnych chemokin pozwala przewidywać następstwa poszczególnych działań terapeutycznych i poprawić ich skuteczność.

Podrozdział 4.3 stanowi zaś podsumowanie wyników przedstawionych w pracy wynikowej pt.: “ *CCL18 Expression Is Higher in a Glioblastoma Multiforme Tumor than in the Peritumoral Area and Causes the Migration of Tumor Cells Sensitized by Hypoxia* ” i dowodzi, iż w guzie glejaka wielopostaciowego ekspresja cytokiny CCL18 ulega zwiększeniu, zmieniona jest również ekspresja jej receptorów CCR8 i PITPNM3. W ramach przeprowadzonych przez Doktoranta badań stwierdzono również znamienne różnice w ekspresji CCL18 i jej receptorów u kobiet i mężczyzn, które mogą tłumaczyć większą zachorowalność i śmiertelność mężczyzn chorujących na GBM. W mikrośrodowisku guza glejaka wielopostaciowego objętym hipoksją doszło do nagromadzenia makrofagów. Charakterystyka warunków panujących w tym obszarze guza prowadziła do różnicowania tych komórek do fenotypu M2, który charakteryzuje się zwiększoną ekspresją CCL18. Zwiększona ekspresja CCL18 oraz PITPNM3 w guzie nowotworowym w następstwie niedotlenienia skutkowałą pobudzeniem migracji komórek nowotworowych. Wyniki uzyskane przez Doktoranta wskazują, że komórki GBM migrują z obszarów niedotlenionych, co może być ważne dla zrozumienia mechanizmów nowotworzenia. Mechanizm ten może przyczyniać się do inwazji/rozsiewu guza GBM i pogorszenia rokowania dla chorych. Dane eksperymentalne wskazują również, że przeżycie pacjentów z wysoką ekspresją PITPNM3 i/lub CCL18 ma gorsze rokowanie niż tych z niższą ekspresją tych genów. Niniejsza praca to cenne i wartościowe źródło wiedzy, dostarczające ważnych danych, które mogą okazać się pomocne w lepszym zrozumieniu mechanizmów onkogenezy. Uzyskane przez Doktoranta wyniki wyznaczają również dalszy kierunek badań, mających na celu określenie mechanizmu, za pomocą, którego niedotlenienie uwrażliwia komórki GBM na CCL18, jak również badania

znaczenia receptora PITPNM3 w migracji komórek GBM w warunkach niedotlenienia. Szczególnie przydatne mogą być eksperymenty z wykorzystaniem siRNA lub shRNA ukierunkowanych na receptory PITPNM3 i CCR8. Wobec powyższego, podjęte przez Doktoranta badania to bardzo wartościowe studium o walorach zarówno poznawczych jak i aplikacyjnych, stanowiąc ważny punkt wyjścia do dalszych analiz.

Zaprezentowane przez Doktoranta rezultaty badań oraz wynikające z nich wnioski zostały poprawnie sformułowane i stanowią przejrzystą odpowiedź na założone cele.

Przedstawiona do oceny praca doktorska dowodzi znakomitej znajomości analizowanego tematu, warsztatu badawczego, olbrzymiego wkładu pracy i umiejętności interpretacyjnych niezbędnych do uzyskania założonych celów. Na uwagę zasługuje fakt, iż wyniki badań Doktoranta zostały opublikowane w renomowanych, specjalistycznych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym i wysokim współczynniku oddziaływania. Wysokie wskaźniki bibliometryczne (sumaryczny **IF 18** oraz łączna **liczba punktów ministerialnych 420**), łącznie z wysoką liczbą cytowań publikacji wchodzących w skład dysertacji, dowodzą wysokiej wartości merytorycznej prac, jak również aktualności podjętej przez Doktoranta tematyki badawczej. W dwóch pracach stanowiących podstawę dysertacji, lek. Szymon Grochans ma wiodący wkład w ich powstanie (jest pierwszym autorem). Praca została właściwie zaplanowana, bardzo dobrze wykonana, a uzyskane wyniki dowodzą, iż patofizjologia GBM ma bardzo złożony charakter i do dnia dzisiejszego nie wszystkie jej aspekty są do końca poznane.

Reasumując, całość rozprawy lek. Pana Szymona Grochansa oceniam bardzo dobrze. Przedstawioną do recenzji pracę uważam za niezwykle wartościową, ważną z punktu widzenia diagnostyki, leczenia i rokowania chorych z glejakiem wielopostaciowym. Przedstawiona do oceny dysertacja wnosi nowe, cenne dane, z których możemy wnioskować, iż zwiększona ekspresja CCL18 oraz PITPNM3 w komórkach nowotworowych w następstwie hipoksji indukuje migrację komórek nowotworowych, stymulując inwazję GBM. Otrzymane wyniki badań stanowią o oryginalności i nowatorskim charakterze dysertacji, wnosząc nowe informacje na temat roli CCL18 i jej receptorów w migracji komórek GBM uwrażliwionych na niedotlenienie. Dane te wydają się mieć bardzo duże znaczenie w aspekcie zdrowia publicznego. Sugerują również, konieczność prowadzenia dalszych badań mających na celu zbadanie i wyznaczenie potencjalnych molekularnych mechanizmów, za pomocą, których niedotlenienie uwrażliwia komórki GBM na CCL18, jak również dalszych badań nad znaczeniem receptora PITPNM3 w migracji komórek GBM w warunkach niedotlenienia.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. z 2017 r, poz. 1789 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Wydziału Medycyny i Stomatologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego (PUM) w Szczecinie o dopuszczenie lek. Pana Szymona Grochansa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę duży aspekt poznawczy i edukacyjny pracy jak również nowatorski a zarazem aplikacyjny charakter prezentowanych przez Doktoranta badań wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej pracy.

Z poważaniem,

Dr hab. n. med. Magdalena Gąssowska-Dobrowolska

