

Kraków, 14 października 2018 r



UNIwersYTET  
JAGIELLOŃSKI

COLLEGIUM  
MEDICUM

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ lek. med. Wojciecha Grabonia**

**pt. „Wpływ hipoksji i normoksji tkankowej na efekt Warburga w  
komórkach raka jelita grubego”**

**Charakterystyka formalna rozprawy:**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska lek. med. Wojciecha Grabonia pt. „Wpływ hipoksji i normoksji tkankowej na efekt Warburga w komórkach raka jelita grubego” oparta jest na zestawie dwóch opublikowanych prac, w których doktorant jest pierwszym autorem – doświadczalnej (Graboń W., Otto-Ślusarczyk D., Chrzanowska A., Mielczarek-Puta M., Joniec-I., Słabik K i Barańczyk-Kuźma: Lactate formation in Primary and Metastatic Colon Cancer Cells at Hypoxia and Normoxia, *Cell Bioch. & Function.* 2016, 34, 483-490; *IF=2,142*) i przeglądowej/poglądowej (Graboń W., Otto-Ślusarczyk D i Barańczyk-Kuźma: Wpływ tlenu na efekt Warburga: czy w komórkach nowotworowych mleczań powstaje tylko z glukozy? Influence of oxygen on the Warburg effect: do cancer cells produce lactate only from glucose?, *Post.Hig.Med.Dośw.*, 2018, 72, 481-490; *IF=1,106*). Rozprawa doktorska skonstruowana jest w klasyczny sposób, a wspomniane powyżej prace stanowią jej trzon. Ponadto włączone są typowe rozdziały jak: Spis treści, Wykaz stosowanych skrótów, Streszczenie w j. polskim i j. Angielskim (Abstract), Wstęp, Założenia i cel pracy, oraz Podsumowania i wnioski, a także Oświadczenia współautorów, w których określili swój udział w przeprowadzeniu badań i przygotowaniu publikacji, co pozwala uznać, że wkład doktoranta jest zasadniczy i znacznie przekraczający wkład pozostałych badaczy, a tym samym traktować rozprawę doktorską jako autorskie dzieło doktoranta.

Wydział Lekarski

Katedra

Biochemii Lekarskiej

ul. Kopernika 7

PL 31-034 Kraków

tel./fax +48 12 422 32 72

+48 12 422 74 00

+48 12 424 72 29

kbl\_sekr@cm-uj.krakow.pl

www.biochemia.cm-uj.krakow.pl

Badania będące przedmiotem pracy doktorskiej wykonane zostały przez lek. W. Grabonia w Katedrze i Zakładzie Biochemii I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Barańczyk-Kuźmy – promotora pracy w ramach finansowania statutowego Katedry i Zakładu Biochemii WUM, 1 WK/N/2013/2014.

### **Charakterystyka formalna rozprawy:**

Uważne zapoznanie się z wynikami pracy i ich interpretacją pozwala rozpoznać w doktorancie dojrzałego, bardzo dobrze znającego przedstawione w rozprawie doktorskiej zagadnienia i doskonale operującego szeroką na ich temat wiedzą oraz wnikliwego, krytycznego i odważnego badacza, który nie waha się postawić, kontrowersyjne na pierwszy rzut oka, tezy.

Fakt podjęcia przez doktoranta badań nad wpływem warunków tlenowych na zużycie glukozy w komórkach nowotworowych świadczy o umiejętności krytycznego spojrzenia na ustalone i powszechnie nierzadko akceptowane bez głębszej refleksji poglądy naukowe.

Trzymane przez doktoranta wyniki zmuszają przede wszystkim do weryfikacji poglądów odnośnie efektu Warburga, co samo w sobie jest znaczącym osiągnięciem, a ponadto zwracają uwagę na konieczność uwzględnienia, często pomijanego, faktu panowania

w tkankach innych warunków tlenowych (normoksja fizjologiczna – średnio 10% tlenu) niż w warunkach często stosowanych w przypadku tego typu badań (normoksja atmosferyczna – 21% tlenu).

Doktorant wraz z zespołem, którego w zakresie przeprowadzonych badań był niekwestionowanym koordynatorem (Oświadczenia współautorów, str. 38 - 47 rozprawy doktorskiej), wykazał – posługując się stosunkowo skromnymi, ale aktualnie przyjętymi i akceptowanymi oraz całkowicie wystarczającymi do ich przeprowadzenia metodami (stosowane w biochemii/biologii komórki podstawowe techniki analityczne, HPLC, hodowle komórkowe, real-time PCR, oznaczenia biochemiczne, stosowna analiza statystyczna) istotną rolę glutaminolizy – kanonicznej przebiegającej z wykorzystaniem enzymów cyklu Krebsa i niekanonicznych jej wersji wykorzystujących działające niejako „pod prąd” mitochondrialne i cytoplazmatyczne dehydrogenazy: izocytrynianową (redukcyjna karboksylacja alfa-ketoglutaranu) i cis-akonitazy (przekształcenie izocytrynianu do cytrynianu) – w syntezie mleczanu.



Doktorant wyszedł z krytycznego założenia, że wyniki badań prowadzonych nad metabolizmem glukozy w komórkach nowotworowych, odzwierciedlają nie do końca prawdziwe / autentyczne warunki (środowisko) w porównaniu z tymi, które panuje w tkance *in vivo*. W związku z tym doktorant stosując dogodny do przeprowadzenia badań model – ustabilizowane linie hodowlane komórek nowotworowych z różnych stadiów rozwoju raka jelita grubego (pierwotne – SW480 i przerzutowe – SW620) – wprowadził, w celu oceny wykorzystania przez nie glukozy, warunki zbliżone do panujących w organizmie poprzez zastosowanie niższych stężeń tlenu – 1% odpowiadającego hipoksji, 10% - odpowiadającego fizjoksji (normoksja fizjologiczna) oprócz porównawczo hodowanych w standardowym dla tego typu badań środowisku, zawierającym 21% tlenu (normoksja atmosferyczna). Przeanalizowano również wpływ różnych warunków tlenowych na proliferację badanych komórek nowotworowych, a także wpływ L-seryny i L-asparaginy na konsumpcję przez nie glukozy i produkcję mleczanu. Wyniki jednoznacznie wykazały, że warunki normoksji atmosferycznej nie odzwierciedlają sytuacji *in vivo*. Uzyskane wyniki pozwalają na weryfikację spojrzenia na interpretację efektu Warburga (Nobel, 1931), że mleczan jest końcowym produktem glikolizy i powstaje również z pirogronanu w obecności tlenu, wyraźnie wskazując, że warunki tlenowe zbliżone do panujących w tkankach (1% - 10%) w nie mają wpływu na stosunek powstającego pirogronianu do zużytej glukozy zarówno w pierwotnych jak i metastatycznych komórkach raka jelita grubego. Ukazują natomiast znaczącą rolę – zwłaszcza w normoksji fizjologicznej (10% tlen) – glutaminolizy, która szczególnie w komórkach metastatycznych przyczynia się do syntezy mleczanu dostępnymi szlakami (kanoniczne i niekanoniczne mechanizmy).

Wnikliwa, dogłębna i trafnie przeprowadzona przez doktoranta dyskusja w pracy przeglądowej/poglądowej (Graboń i wsp., 2018) w nawiązaniu do wyników badań przedstawionych w pracy eksperymentalnej (Graboń i wsp., 2016) pozwala na określenie roli czynnika indukowanego hipoksją, HIF oraz czynnika transkrypcyjnego związanego z procesem nowotworowym, c-myc, a także wzajemnych ich relacji (hamowanie c-myc przez HIF w hipoksji) w procesie powstawania mleczanu w różnych warunkach tlenowych w jakich egzystują komórki nowotworowe. Dostępna i cytowana literatura przedmiotu w pełni potwierdza pogląd doktoranta odnośnie wspomnianej już uprzednio roli glutaminolizy w tym procesie w normoksji fizjologicznej. Zmusza również do zweryfikowania poglądów odnośnie pochodzenia mleczanu w komórkach nowotworowych, którego źródłem są glikoliza i glutaminoliza ze zmiennym, w zależności od ilości dostępnego tlenu, udziałem. To niezwykle fortunny zbieg okoliczności dla doktoranta, gdyż pokazuje, że ustalonych



poglądów nigdy nie należy traktować jako niepodważalne i w miarę zdobywanej wiedzy i szczegółowego poznawania studiowanych zagadnień należy je odważnie weryfikować, co też doktorant uczynił.

Fakt podjęcia tego typu badań doskonale wpisuje się również w stale aktualną tematykę dotyczącą mechanizmów uruchamianych w komórkach (nie tylko zresztą nowotworowych) w wyniku spadku podaży tlenu – występowaniem stanu nazywanego normoksja fizjologiczna (10% tlenu) czy hipoksja (< 10% tlenu). Trudno było o bardziej fortunny czas przedłożenia rozprawy doktorskiej niż rok, w którym Komitet Noblowski za odkrycie HIF (czynnik indukowany hipoksją) i wyniki badań nad szczegółami mechanizmów jego działania przyznaje trzem wybitnym uczonym (G. Semenza, P.J. Ratcliffe, W.G. Kealin Jr.) Nagrodę Nobla w dziedzinie Fizjologii i Medycyny. Fakt jej przyznania za badania w tematyce, w której doktorant jest od lat żywotnie zainteresowany, doskonale świadczy o ich aktualności i stanowi niewątpliwą zachętę do ich kontynuowania.

### **Wniosek końcowy.**

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że dysertacja doktorska lek Wojciecha Grabonia pt. „Wpływ hipoksji i normoksji tkankowej na efekt Warburga w komórkach raka jelita grubego” prezentuje wyniki oryginalnych badań przeprowadzonych z wykorzystaniem aktualnie stosowanych, powszechnie akceptowanych metod badawczych biologii komórki i molekularnej wspartych niezbędnymi biochemicznymi technikami analitycznymi. Stanowi spójne, dojrzałe opracowane dzieło, które prezentuje oryginalne rozwiązanie problemu badawczego wnoszące istotne, nowe treści do nauki. Jednocześnie wykazuje, że doktorant posiada zadowalającą wiedzę w dyscyplinie naukowej będącej przedmiotem Jego zainteresowania, a także umiejętność planowania i prowadzenia badań oraz krytycznego interpretowania ich wyników w świetle dostępnej na chwilę obecną literatury przedmiotu. Przedstawione i przedyskutowane oraz opublikowane już wyniki stanowią bez wątpienia oryginalny i trwały wkład do nauki oraz otwierają dalsze interesujące obszary badawcze, co stanowi o niezaprzeczalnych walorach rozprawy doktorskiej lek. med. Wojciecha Grabonia.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia wszelkie wymogi zwyczajowe, stawiane pracom doktorskim, jak również warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce [Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.]).

Praca doktorska lek. med. Wojciecha Grabonia w pełni kwalifikuje doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego, o co wnoszę do Rady I Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie.

Mając na uwadze przedstawioną powyżej ocenę, walory merytoryczne dysertacji oraz wynikającą z niej sugestię o prowadzeniu badań nad metabolizmem energetycznym komórki nowotworowej w warunkach normoksji fizjologicznej lub hipoksji, a nie w normoksji atmosferycznej wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lek. med. Wojciecha Grabonia.



Prof. dr hab. Piotr Laidler