



UNIwersytet Medyczny im. Karola
Marcinkowskiego w Poznaniu
Katedra Biotechnologii Medycznej
Zakład Immunologii Nowotworów

Ul. Garbary 15 Telefon: + 48 61 8850-665
61-866 Poznań Fax.: + 48 61 8528502
dizycki@gmail.com, dmizy@ump.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarza Wojciecha Jakuba Solarka pod tytułem: „Wpływ insuliny i insulino-podobnych czynników wzrostu na komórki raka nerki”, wykonanej w ramach Studium Medycyny Molekularnej Centrum Biostruktury, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem promotora, profesora doktora habilitowanego Cezarego Szczylika

Rak nerki (RCC) stanowi nie tylko ogromny problem społeczny, ale również ekonomiczny. Pomimo coraz powszechniejszego dostępu do badań obrazowych, zachorowalność i śmiertelność z powodu raka nerki od wielu lat systematycznie wzrasta. W Polsce, w 2015 roku, liczba zachorowań wyniosła 5077 tysięcy przypadków oraz 2679 zgonów, co stanowi ponad 50 procent wszystkich, zdiagnozowanych pacjentów. Tak wysoka liczba zgonów związana jest ze relatywnie późnym rozpoznaniem RCC, co w znacznym stopniu pogarsza rokowanie i de facto uniemożliwia skuteczną terapię onkologiczną. Wśród wielu, dobrze poznanych i udowodnionych czynników ryzyka raka nerki można wyodrębnić uwarunkowania genetyczne, związane z mutacją w genie supresorowym von Hippel Lindau oraz pozagenetyczne, do których należą - między innymi- palenie tytoniu, nadciśnienie, otyłość oraz cukrzyca. Liczne dane literaturowe wskazują na wieloczynnikowy charakter powstawania nowotworów u diabetyków, który obejmuje hiperglikemię zależną od insulinooporności oraz wtórna hiperinsulinemię, która indukuje mitogenną aktywność receptorów insulinowych i insulino-podobnych czynników wzrostu. Jednak pomimo licznych, opublikowanych wyników badań doświadczalnych oraz prób klinicznych, udział insuliny i insulino-podobnych czynników wzrostu w regulacji ekspresji kluczowych genów biorących udział w nasileniu proliferacyjnej aktywności guza oraz zmiany fenotypu komórek RCC na metastatyczny nie jest do końca poznany. W mojej opinii, podjęta przez Doktoranta tematyka wpisuje się w dynamicznie rozwijającą się dziedzinę poszukiwań swoistych biomarkerów oraz wyodrębnienia unikalnych portretów genetycznych RCC, umożliwiających określenie czynników prognostycznych i predykcyjnych tej choroby. Stąd wybór tematu rozprawy doktorskiej uważam za w pełni uzasadniony.

Zaprezentowana mi do oceny dysertacja liczy 86 numerowanych stron i ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Praca składa się ze spisu treści poprzedzonym informacjami o źródle

finansowania pracy doktorskiej oraz autorskiej bibliografii, która stanowiła źródło danych literaturowych wykorzystanych w projekcie. Pragnę nadmienić, iż w trzech zaprezentowanych pozycjach Kandydat był pierwszym a w jednej trzecim autorem. W dalszej części, dzieło zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów stosowanych w tekście, wstęp w formie przeglądu literatury, cele pracy, materiały i metody stosowane w projekcie, wyniki, dyskusję, wnioski oraz piśmiennictwo. W spisie treści, w podrozdziale "Analiza technikami biologii molekularnej" autor pracy umieścił cytometrię przepływową, którą - moim zdaniem - należy zaliczyć do metod laboratoryjnych wykorzystywanych w badaniach naukowych i w diagnostyce klinicznej. Z kolei w rozdziale "Wykaz skrótów" stwierdziłem obecność nielicznych błędów edytorskich takich jak: insulinopodobne czynniki wzrostu zamiast insulino-podobne czynniki wzrostu, receptor insuliny typu A/typu B oraz brak angielskiego tłumaczenia nazwy kinaz serynowo-treoninowych.

We wstępie twórca dysertacji, w obszerny sposób przedstawił tematykę jasnokomórkowego raka nerki koncentrując się na epidemiologii, patofizjologii, czynnikach ryzyka oraz leczeniu RCC. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo rzetelnie przedstawiony temat genetycznych uwarunkowań raka nerki oraz umieszczenie wzmianki o personalizowanej terapii onkologicznej za pomocą inhibitorów angiogenezy, blokerów szlaku mTOR a także immunoterapii. Doktorant precyzyjnie opisał główne dziedziczne zespoły predysponujące do rozwoju RCC oraz wskazał na konieczność poszerzenia molekularnej diagnostyki guzów w celu wyodrębnienia swoistych, genetycznych profili raka nerki lub zwalidowanych biomarkerów predykcyjnych. W dalszej części rozdziału Doktorant skupił się na roli insuliny i insulino-podobnych czynników wzrostu w rozwoju raka nerki, skrupulatnie opisując ich rolę w molekularnych mechanizmach indukujących wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnału. Informacje te poparte są cytowaniami klasycznych i aktualnych pozycji piśmiennictwa światowego. Wprawdzie niewielka część poruszanych zagadnień została potraktowana przez autora dość ogólnie, jednak w mojej opinii zademonstrowana wiedza jest wystarczająco zrozumiała nawet dla słabiej zorientowanego czytelnika. W podsumowaniu tego rozdziału Autor dysertacji trafnie stwierdził, że opublikowane wyniki badań dotyczących roli insuliny i insulino-podobnych czynników wzrostu nie dają jednoznacznej odpowiedzi na następujące pytania: i) czy rola ww. czynników może mieć wpływ na ryzyko zachorowania i progresję raka nerki oraz ii) czy wyżej wymienione biomarkery mogą mieć aplikacyjny potencjał w klinice raka nerki, jako czynniki prognostyczne.

Konkludując pragnę podkreślić, iż przedstawione we wstępie zagadnienia i kolejność ich omawiania stanowi logiczny ciąg, dobrze prowadzący czytelnika w główny nurt tematyczny i cel pracy.

Lektura tego rozdziału wskazuje na bardzo dobrą znajomość problematyki będącej tematem niniejszej rozprawy oraz potwierdza szeroko pojętą wiedzę Doktoranta.

Ubiegający o stopień doktora zdefiniował główny cel pracy, którym była: i) weryfikacja hipotezy zakładającej promowanie wzrostu komórek raka nerki przez insulinę i insulino-podobne czynniki wzrostu oraz ii) potwierdzenie istnienia funkcjonalnej pętli wzajemnego oddziaływania ww czynników na drodze para- i autokrynowego pobudzania. Aby udowodnić powyższe hipotezy Autor dysertacji zaplanował szereg badań mających na celu - między innymi - ocenę występowania receptorów insulinowych i insulino-podobnych czynników wzrostu na powierzchni linii komórkowych raka nerki oraz analizę ekspresji genów połączonych ze ścieżkami transdukcji sygnałów insuliny i IGF. Cele pracy zostały sformułowane, prawidłowo, bardzo przejrzysto i w zrozumiały sposób, stąd nie mam do tego rozdziału najmniejszych zastrzeżeń.

Metodyka zaplanowanych w pracy zadań badawczych została opisana w dość jasny, spójny i czytelny sposób. Doświadczenia zostały przeprowadzone w modelu in vitro na trzech komercyjnie pozyskanych liniach komórkowych raka nerki izolowanych z pierwotnego guza, dwóch liniach otrzymanych z przerzutów raka nerki i linii kontrolnych pochodzących ze zdrowej nerki oraz linii nerki embrionalnej. Hodowle komórkowe utrzymywane były w warunkach jednowarstwowej monokultury w mediach dedykowanych, zgodnych z zaleceniami dostawcy. Wybór linii komórkowych w celu przeprowadzenia doświadczeń zaplanowanych w projekcie uważam za prawidłowy. Następnie autor dysertacji szczegółowo opisał metodykę oceny proliferacji i żywotności komórek, zdolności migracyjnych, techniki cytometrii przepływowej, metody wykorzystane w analizie obecności receptorów insulinowych i insulino-podobnych czynników wzrostu oraz techniki badania ekspresji genów związanych ze szlakiem sygnałowym powiązanych z insuliną. Schematycznie zobrazowanie technik badawczych użytych w pracy przedstawia rycina trzecia, która jest autorskim dziełem Doktoranta. Z obowiązku recenzenta pragnę nadmienić, iż w opisie metodyki nie znalazłem informacji o izotypie i idotypie przeciwciał użytych w cytometrii przepływowej oraz źródła pochodzenia i gatunku docelowego epitopu. Uzupełnieniem do prawidłowo opisanych technik badawczych jest informacja o metodach statystycznych zastosowanych w dysertacji.

Podsumowując, dobór materiałów i metod oraz konstrukcja założeń badawczych w celu realizacji zaplanowanych doświadczeń jest prawidłowy, a cały rozdział oceniam bardzo dobrze.

Uzyskane wyniki zostały opisane dobrze i przejrzysto zilustrowane ośmioma, czytelnymi rycinami oraz trzema zrozumiałymi tabelami. Bardzo ciekawą część tego rozdziału stanowi sumaryczne zestawienie ewaluacji żywotności, krzywej wzrostu, potencjału migracyjnego oraz testu gojenia rany,

które jednoznacznie potwierdziły, nie tylko zwiększoną żywotność linii komórkowych pochodzących z guzów przerzutowych raka nerki, ale również szybszy proces zarastania rany we wszystkich badanych kulturach monowarstwowych. W wyniku przeprowadzonych badań Autor pracy jednoznacznie wykazał, że insulina i insulino-podobne czynniki wzrostu są czynnikami aktywującymi żywotność, proliferację i potencjał migracyjny komórek raka nerki. Ponadto, Doktorant wykazał, że wpływ insuliny na badane komórki odbywa się poprzez aktywację IGF-1R oraz wykluczył obecność funkcjonalnej pętli wzajemnego wzbudzenia na drodze para- i autokrynowej. Z punktu widzenia onkologa, szczególnie wartościowe są wyniki badań aktywności insuliny i insulino-podobnych czynników wzrostu, które potwierdziły zmiany w ekspresji niektórych genów, związanych z kluczowymi ścieżkami transdukcji sygnałów PI3K-Akt-mTOR i Ras-MAP. Uważam, że pogłębione doświadczenia mające na celu precyzyjne określenie udziału insuliny i insulino-podobnych czynników wzrostu w aktywacji ww. szlaków sygnałowych mogą być wykorzystane w klinice raka nerki ze względu na duży potencjał aplikacyjny.

Podsumowując tę część dysertacji pragnę podkreślić, iż jestem pod wrażeniem pomysłowości Doktoranta, którego inwencja twórcza pozwoliła nie tylko stworzyć, na pozór, skomplikowane ryciny, ale również bardzo przejrzyste i zrozumiałe tabele.

W dyskusji, która została napisana w profesjonalny sposób zarówno pod względem formalnym i merytorycznym, ubiegający się o stopień przeanalizował wyniki w świetle dostępnego piśmiennictwa. Doktorant pokusił się również o dość szczegółową analizę i omówienie technicznych aspektów prowadzonych badań, koncentrując się na wynikach oceny ekspresji genów powiązanych ze ścieżką przekazywania sygnałów insuliny i insulino-podobnych czynnikach wzrostu po stymulacji IGF-1 i IGF-2. Pragnę dodać, iż dyskusja jest obszerna i obejmuje wszystkie aspekty uzyskanych wyników, łącznie z wykazaniem słabych i mocnych stron pracy. Rozdział ten jest merytorycznie wartościowy i świadczy o ugruntowanej wiedzy w zakresie badanej problematyki, a także dojrzałości Autora dysertacji w formułowaniu i analizowaniu zagadnień badawczych. Wnioski są zdefiniowane prawidłowo i znajdują potwierdzenie w przedstawionych w dysertacji wynikach.

Rozprawa doktorska zawiera piśmiennictwo obejmujące 110 pozycji w języku polskim i angielskim, wymienione zgodnie z poruszaną tematyką. Bibliografia zawiera publikacje zarówno starsze historycznie (np. z 1985 r.), jak i aktualne. Literatura naukowa cytowana w niniejszym opracowaniu jest odpowiednio dobrana i właściwie wykorzystana w tekście rozprawy. Należy zaznaczyć, że ponad 90% pozycji piśmiennictwa stanowią publikacje z ostatnich dziewięciu lat.

Z obowiązku recenzenta należy wymienić stosunkowo drobne uchybienia zauważone podczas lektury niniejszej rozprawy, takie jak; i) nieliczne błędy literowe i interpunkcyjne, a także, ii) błędy w nazewnictwie niektórych skrótów. Powyższe przeoczenia opisałem we wcześniejszych rozdziałach tej pracy. Uwagi te jednak nie zmniejszają wartości merytorycznej recenzowanej dysertacji.

Pomimo pewnych, krytycznych uwag zgłoszonych przeze mnie moja opinia o przedstawionej rozprawie jest bardzo dobra. Doktorant zrealizował wszystkie postawione przed sobą cele badawcze. Zaprezentowane badania są oryginalne i stanowią istotny wkład w nowoczesną metodologię badań przedklinicznych w onkologii. Godny podkreślenia jest również fakt, iż badania lekarza Wojciecha Jakuba Solarka wpisują się w nurt dyscypliny *translational science*, czyli powiązania nauk podstawowych z klinicznymi procedurami terapeutycznymi. Jestem również pod wrażeniem ogólnej pomysłowości Doktoranta, Jego pracowitości oraz umiejętności technicznych. Praca napisana jest starannie, w dobrym stylu, z jak wcześniej wspomniałem nielicznymi błędami językowo - redakcyjnymi.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska lekarza Wojciecha Jakuba Solarka charakteryzuje się trafnością wyboru tematu. W analizowanej dysertacji Doktorant wykazał się umiejętnością sformułowania celów zaplanowanych badań naukowych a także wniosków z nich wypływających oraz wykorzystania dostępnej bibliografii. Dysertacja jest spójna tematycznie i przyczynia się do lepszego poznania omawianej tematyki, toteż po opublikowaniu, może być cennym uzupełnieniem dostępnego piśmiennictwa naukowego. Uważam, że praca ma dużą wartość poznawczą i kliniczną i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych w tej dziedzinie.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa lekarza Wojciecha Jakuba Solarka spełnia wszystkie ustawowe wymogi i kryteria, jakim powinna odpowiadać praca na stopień doktora nauk medycznych. Uwagi krytyczne zawarte w mojej recenzji nie mają wpływu na wysoka ocenę pracy, niemniej oczekuję, że Autor odniesie się do nich i wyjaśni wszystkie moje wątpliwości w trakcie publicznej obrony pracy. Uważam, że Autor dysertacji osiągnął stopień dojrzałości naukowej uprawniający Go o ubieganie się o stopień doktora i w związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lekarza Wojciecha Jakuba Solarka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy, ze względu na nowatorski charakter przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników oraz całokształt aktywności naukowej.


Dr hab.n.med. Dariusz Łycki