



UNIWERSYTET RZESZOWSKI  
ZAKŁAD HISTOLOGII I EMBRIOLOGII  
ul. Leszka Czarnego 4, 35-615 Rzeszów  
tel. 178518900, e-mail: knm@ur.edu.pl

Recenzja pozytywna  
Przewodnicząca  
Rady Dyscypliny Nauki Medycznej  
dr hab. Katarzyna Sierakowska, prof. UMK



PODPIS ZAUFANY  
AGATA TERESA  
WAWRZYŃIAK  
25.07.2023 12:54:27 (GMT+2)  
Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym

dr hab. Agata Wawrzyniak prof. UR  
Zakład Histologii i Embriologii  
Instytut Nauk Medycznych  
Kolegium Nauk Medycznych UR

Rzeszów, 11.07.2023r.

## Recenzja

### Rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Marii Opackiej pt.: „Ekspresja cykliny Y w wybranych liniach nowotworowych po indukcji śmierci komórki.”

Pani mgr Aleksandra Maria Opacka wykonała pracę w Katedrze Histologii i Embriologii, Wydziału Lekarskiego, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem Pani dr hab. n. med. Agnieszki Żuryń, prof. UMK. Należy podkreślić znaczący dorobek naukowy Doktorantki, który obejmuje łączną wartość punktacji KBN/MEiN: 200 oraz wartość wskaźnika IF: 8,011.

Przedstawiona mi do recenzji praca jest interesująca i ważna, ponieważ zgodnie z obecnym stanem wiedzy choroby nowotworowe to jedna z najbardziej rozpowszechnionych grup chorób, które charakteryzują się niekontrolowanym wzrostem i podziałem komórek. Zdrowe komórki podlegają zrównoważonym procesom, a nowo powstające zastępują stare, uszkodzone lub martwe. Transformacja nowotworowa następuje w wyniku mutacji powstałych podczas proliferacji i różnicowania komórek, syntezy oraz naprawy DNA, a także na drodze regulacji procesu śmierci komórki. Niezmieniony przebieg wymienionych procesów wyznaczany jest przez poprawny przebieg cyklu komórkowego. Jednymi z najważniejszych białek regulujących cykl komórkowy są cykliny, które należą do pozytywnych regulatorów cyklu komórkowego. W związku z powyższym utrzymanie prawidłowego poziomu cyklin jest niezbędne w wielu procesach komórkowych, a nieprawidłowa ekspresja białek regulatorowych przyczynia się do powstawania różnego typu nowotworów.

W przeprowadzonej rozprawie, Doktorantka dokonała oceny wpływu wzrastających dawek dwóch związków wykazujących działanie indukujące śmierć komórki tj. cisplatyny i ikarytyny na przeżywalność komórek ich morfologię, cykl komórkowy, potencjał

migracyjny oraz rodzaj indukowanej śmierci komórek. Ponadto Doktorantka dokonała oceny ekspresji cykliny Y w liniach komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuc A549 i H1299. Niniejsza praca posiada duże walory poznawcze, ponieważ do tej pory nie zbadano wpływu cisplatyny i ikarytyny na ekspresję cykliny Y w komórkach obu tych linii.

Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna ją obszerny wstęp literaturowy liczący 25 stron, w którym Autorka podsumowała dotychczasową wiedzę i w czytelny sposób zaprezentowała charakterystykę raka płuc, który obecnie należy do grupy najczęściej występujących nowotworów złośliwych. Następnie wyjaśniła skomplikowany opis cyklu komórkowego, który jest szeregiem zmian fizycznych, chemicznych i strukturalnych komórki, kontrolowany przez białka cyklu komórkowego w tym cykliny Y oraz punkty kontrolne. W bardzo przystępny sposób wprowadza czytelnika w zagadnienia związane ze śmiercią komórkową, jako procesem niezbędnym do utrzymania prawidłowej homeostazy tkanek oraz eliminacji szkodliwych komórek, do których należą między innymi komórki nowotworowe. We wstępie nie zabrakło również wprowadzenia dotyczącego cisplatyny, leku stosowanego w chemioterapii nowotworów oraz ikarytyny, która wykazuje szereg funkcji farmakologicznych i biologicznych zarówno w chorobach nienowotworowych, jak i w samych nowotworach. Rozdziały te stanowią idealne wprowadzenie czytelnika do badań własnych Doktorantki. W prezentowanym rozdziale Autorka wykazała doskonałą znajomość aktualnej wiedzy dotyczącej tematu pracy, a analiza bieżącego piśmiennictwa stanowi solidne i przejrzyste przedstawienie zagadnień związanych z tematem dysertacji.

Przedstawione po wstępie cele zostały jasno sformułowane. W kolejnych rozdziałach Doktorantka w sposób szczegółowy i nie budzący żadnych zastrzeżeń przedstawiła materiał, metodykę oraz osiągnięte wyniki. W niniejszej dysertacji materiał badawczy stanowiły dwie linie niedrobnokomórkowego raka płuc. Pierwsza to linia A549, która posiada aktywne białko p53, druga to linia H1299 pozbawiona tego białka. W celu wykazania ekspresji cykliny Y, obie linie komórkowe poddano działaniu cisplatyny w stężeniu 10 i 30  $\mu\text{M}$  oraz ikarytyny w stężeniu 30 i 60  $\mu\text{M}$ . Wykorzystany w badaniach materiał posłużył do analizy morfologicznej komórek, oceny ich przeżywalności, oceny cyklu komórkowego, potencjału migracyjnego komórek oraz rodzaju indukowanej śmierci. Dodatkowo materiał badawczy pozwolił dokonać analizy tempa migracji komórek oraz wewnątrzkomórkowego procesu powstawania kryształów ikarytyny.

W swojej rozprawie Doktorantka posłużyła się różnorodnymi metodami badawczymi. W celu określenia przeżywalności komórek zastosowano test analizy aktywności metabolicznej komórki MTT. Mikroskop świetlny z wbudowanym systemem analizy komputerowej obrazu posłużył do charakterystyki morfologicznej komórek. Ocenę potencjału

migracyjnego komórek Doktorantka przeprowadziła na podstawie trzech testów: do tworzenia kolonii, migracji komórek oraz tempa migracji komórek. Cytometr przepływowy posłużył do oceny analizy cyklu komórkowego, procesu apoptozy badanych komórek oraz do oceny profilu ekspresyjnego cykliny Y, białka RRM2 oraz  $\beta$ -kateniny. Podstawą testu przeżycia komórek był test tworzenia kolonii, który polegał na zdolności pojedynczej komórki do proliferacji oraz tworzenia przez dłuższy czas kolonii. Zastosowanie mikroskopu kontrastowo-fazowego wyposażonego w system inkubacji do obrazowania żywych komórek, umożliwił analizę potencjału migracyjnego komórek, natomiast metoda immunofluorescencyjnego znakowania białek dała podstawę do oceny ekspresji cykliny Y.

Zrealizowanie oraz opracowanie tak dużej liczby analiz należało do przedsięwzięć bardzo pracochłonnych, wymagających ogromnej cierpliwości, wytrwałości, a przede wszystkim bardzo dobrego przygotowania i znajomości badanej problematyki. Dzięki zastosowaniu odpowiednio dobranych technik badawczych, Doktorantka wykazała, że komórki linii A549 oraz H1299, wykazywały wrażliwość na cisplatinę i ikarytynę, a wraz ze wzrostem stężenia tych związków oraz wydłużeniem czasu inkubacji liczba komórek uległa obniżeniu. Zgodnie z sugestią Doktorantki mogło to mieć związek z zatrzymaniem cyklu komórkowego oraz indukcją śmierci komórek obu linii. Ponadto przeprowadzone wyniki badań wykazały, że cisplatina wpływała na zwiększenie odsetka komórek obu linii w fazie G2/M cyklu komórkowego, a istotny statystycznie wzrost odsetka komórek późno apoptotycznych obserwowano tylko w linii H1299. Zastosowane metody badawcze pozwoliły wysnuć przypuszczenie, że ikarytyna indukowała śmierć komórek obu linii na drodze apoptozy oraz powodowała obniżenie tempa migracji komórek linii A549 oraz H1299. Ponadto umiejętnie dobrane metody badawcze zastosowane w niniejszej rozprawie umożliwiły Doktorantce wykazanie, że zarówno cisplatina jak i ikarytyna wpływały na zmniejszenie liczby tworzonych kolonii, migrację komórek obu linii, a wzrost ekspresji cykliny Y był zależny od czasu inkubacji, rodzaju oraz dawki zastosowanego związku. Na podstawie badań dodatkowych Doktorantka wykazała wewnątrzkomórkowe tworzenie się kryształów ikarytyny. Sugeruje to potencjalne zagrożenie stosowania tej substancji w terapii nowotworowej, ze względu na efekt uboczny jakim są powstające kryształy.

Dyskusja jest napisana dobrze, a Doktorantka niezwykle umiejętnie przeprowadziła argumentację otrzymanych wyników, potwierdzając godną podziwu znajomość problematyki oraz świetną orientacją w temacie. Doktorantka w bardzo logiczny sposób dowodzi, że poziom ekspresji cykliny Y wzrastała wraz ze zwiększeniem dawek oraz z dłuższym czasem inkubacji cisplatiną oraz ikarytyną. Wzrost ekspresji cykliny Y korelował z zatrzymaniem cyklu komórkowego, wzrostem odsetka komórek apoptotycznych oraz z hamowaniem

potencjału migracyjnego komórek obu linii. Ponadto na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka wysnuła przypuszczenie, że ikarytyna może stanowić potencjalne zagrożenie w leczeniu onkologicznym. Doktorantka przedstawiła wnioski końcowe wynikające z pracy, a uzyskane wyniki pozwoliły jej na sformułowanie 5 logicznych wniosków. Stanowią one meritum do stwierdzenia, że komórki linii A549 oraz H1299 wykazują wrażliwość na cisplatynę oraz ikarytynę, indukują zmiany morfologiczne komórek obu linii, wpływają na zmniejszenie liczby tworzonych kolonii oraz zmniejszenie migracji komórek obu linii. Wzrost ekspresji cykliny Y zależy od czasu oraz rodzaju dawki zastosowanego związku. Podanie związków cytotoksycznych indukuje cyklinę Y, co przyczynia się do zmniejszenia potencjału proliferacyjnego oraz migracyjnego komórek zarówno linii A549 jak i H1299. Bardzo cenną konkluzją niniejszej rozprawy jest stwierdzenie, że ikarytyna może stanowić potencjalne zagrożenie w terapii nowotworowej, ze względu na wewnątrzkomórkowe tworzenie się kryształów.

Rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Marii Opackiej ma formę wydruku komputerowego, liczy 184 strony, układ pracy jest logiczny i przejrzysty. Napisana jest poprawnym językiem polskim, a układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich. Dysertację rozpoczyna czytelny spis treści, po którym znajduje się wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, dane o materiale i metodyce badań, omówienie wyników, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo. Dołączona została również zgoda Komisji Bioetycznej. Wyniki zostały opracowane z bardzo dużą starannością oraz dokładnością. Są one zaprezentowane w sposób przejrzysty, przez co bardzo usprawnia to ich analizę. Opisy wyników są zrozumiałe i przystępne, a całość napisana jest poprawnym językiem, bez nadużywania zwrotów anglojęzycznych. Na podkreślenie zasługuje świetna szata graficzna. W swojej rozprawie Doktorantka umieściła bardzo dobrej jakości 76 fotografii, 24 tabele, 8 schematów oraz 25 wykresów, które ułatwiają ich zrozumienie i przeanalizowanie. Bogate piśmiennictwo jest aktualne, a Doktorantka umiejętnie je zacytowała i krytycznie dobrała do wiedzy teoretycznej dotyczącej omawianych zagadnień. Piśmiennictwo zawiera 154 pozycje literatury, z czego 153 są w języku angielskim. Należy podkreślić, że 102 pozycje obejmują okres ostatnich 10 lat. Doktorantka nie ustrzegła się jednak drobnych błędów.

Strona 14: „Z drugiej strony palacze, którzy pracowali w obecności azbestu, są od 50 do 90 razy bardziej narażeni na zachorowanie...” Należałoby zastosować konstrukcję zdania w czasie przeszłym tj.: Z drugiej strony palacze, którzy pracowali w obecności azbestu, byli od 50 do 90 razy bardziej narażeni na zachorowanie;

Strona 14: „poprzez usunięcie i hodowlę rakowej tkanki płucnej” – w nomenklaturze histologicznej nie ma określenia tkanka płucna, dlatego lepiej byłoby użyć określenia z tkanki

pochodzącej z raka płuc;

Strony: 17, 18, 20, 22: Ryc. 5, 7, 8, 23: Jeżeli schematy są autorstwa Doktorantki lub pochodzą z innego źródła należałoby to uwzględnić;

Strony: 43, 45: „Po inkubacji próbki zwirowano” – Stylistycznie lepiej brzmi próbki odwirowano lub wirowano;

Strony: 68, 71, 90, 95: Ryc. 36, 37, 42, 44. lepiej zastąpić określeniem wykres, ponieważ nawet w opisie jest tak zaznaczone;

Strony 76, 163, 164: „ilość kolonii wynosiła 20%”; „zmniejszenie ilości tworzonych kolonii” – kolonia jest policzalna, dlatego powinno być liczba kolonii;

Strona 151: „ciągłe poszukiwanie markerów prognostycznych jest w zainteresowaniu badaczy” stylistycznie lepiej brzmi np.: ciągłe poszukiwanie markerów prognostycznych znajduje się w kręgu zainteresowań badaczy;

Strona 152: „obniżeniem ilości występujących zgonów” –zgony są policzalne, dlatego powinno być liczby występujących zgonów;

Strona 152: „ciągłe poszukiwania nowych narzędzi profilaktycznych tj. markery prognostyczne” -stylistycznie lepiej brzmi ciągłe poszukiwania nowych narzędzi profilaktycznych tj. markerów prognostycznych;

Strona 152: „mechanizmy oporności na cisplatynę, które dzielą się na cztery kategorie Doktorantka stosuje oznaczenia i ; ii; iii; iv; – Lepiej byłoby zastąpić to numeracją rzymską – odpowiednio: I; II; III; IV;

Strona 152: „Sugeruje się, że komórki nowotworowe, które zawierały białko p53 typu dzikiego były bardziej wrażliwe na terapię onkologiczną (tj. chemioterapia i radioterapia)” - lepiej stylistycznie ....na terapię onkologiczną (tj. chemioterapię i radioterapię)”

Strona 153: „Dostępne analizy potwierdzają wyniki przeprowadzonych w niniejszej pracy badań, które wykazują, że linia komórkowa A549, która posiada aktywne białko p53 wykazywała mniejszą oporność na cisplatynę w porównaniu z linią H1299 z częściową delecją genu TP53. Drobną zmianą stylistyczną zdania brzmiałaby lepiej: Wyniki badań własnych w kontekście dostępnych analiz potwierdzają, że linia komórkowa A549, która posiada aktywne białko p53 wykazywała mniejszą oporność na cisplatynę w porównaniu z linią H1299 z częściową delecją genu TP53;

Strona 153: ”Dlatego wyznaczenie efektywnej dawki cisplatyny, która spowoduje zahamowanie proliferacji komórek...”. Należałoby zastosować konstrukcję zdania w czasie przeszłym -Dlatego wyznaczenie efektywnej dawki cisplatyny która spowodowała zahamowanie proliferacji komórek...

Strona 153: „Spowodowane być to może apoptozą wywołaną związkiem pochodzenia

naturalnego...” Stylistycznie lepiej brzmi: Może być to spowodowane apoptozą wywołaną związkiem pochodzenia naturalnego...;

Strony: 153, 162, 164: Najczęściej obserwowano komórki powiększone z powiększonym jądrem komórkowym” Stylistycznie lepiej unikać jest powtórzeń w tym samym zdaniu, dlatego proponuję zmienić na: Najczęściej obserwowano komórki powiększone, np. z obrzmiałym, przerośniętym jądrem komórkowym;

Strona 154: ”Zastosowanie cisplatyny spowodowało powstawanie komórek powiększonych, w których nastąpiło powiększenie średnicy jądra komórkowego” Proponuję zmienić na: zastosowanie cisplatyny spowodowało powstawanie komórek powiększonych, w których obserwowano wzrost średnicy jądra komórkowego;

Strona 155: „Z kolei po zastosowaniu ikarytyny w przedstawionych w niniejszej pracy badaniach, zatrzymanie cyklu komórkowego nastąpiło w fazie G0/G1, a także zwiększył się odsetek komórek w fazie S w porównaniu z grupą kontrolną”. Proponuję drobną stylistykę zdania: Wyniki badań własnych wykazały, że po zastosowaniu ikarytyny doszło do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G0/G1 oraz wystąpił większy odsetek komórek w fazie S w porównaniu z grupą kontrolną;

Strona 155: „PPAR $\gamma$  ulega wysokiej ekspresji w różnych ludzkich tkankach nowotworowych” W nomenklaturze histologicznej nie ma określenia tkanka nowotworowa;

Strona 161: ”Wyniki przeprowadzonych do niniejszej rozprawy badań oraz analiza dostępnej literatury sugerują” Proponuję drobną stylistykę zdania: W niniejszej rozprawie wyniki przeprowadzonych badań oraz analiza dostępnej literatury sugerują..

Strona 161: „Badania dodatkowe wykonane w celu oceny kryształów wykazały ich nieorganiczny charakter przy zastosowaniu mikroskopu polaryzacyjnego” Proponuję drobną stylistykę zdania Zastosowanie mikroskopu polaryzacyjnego w badaniach dodatkowych w celu oceny kryształów, wykazały ich nieorganiczny charakter;

Strona 161: „Analiza medium hodowlanego z dodatkiem ikarytyny w czasie 48 godzin nie wykazała formowania się kryształów, natomiast ocena przyżyciowa komórek obu linii traktowanych ikarytyną z zastosowaniem mikroskopu kontrastowo-fazowego w czasie 48 godzin ujawniła proces formowania się kryształów prawdopodobnie w komórkach (zaobserwowano, że powstające kryształy przebijają błonę komórkową)”.- Zdanie jest zbyt długie i mało przejrzyste dla czytelnika, proponuję utworzyć dwa oddzielne zdania;

Strona 161:” większa ilość kryształów” - kryształy były policzalne, dlatego większa liczba kryształów;

Strona 163: „Ocena ekspresji cykliny Y w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazała wzrost ekspresji badanego białka” Proponuję unikania powtórzeń w jednym zdaniu: W niniejszej

rozprawie doktorskiej ocena ekspresji cykliny Y wykazała wzrost aktywności badanego białka;

Strona 166: „ilość komórek uległa obniżeniu” powinno być liczba komórek uległa obniżeniu;

W piśmiennictwie należałoby ujednoczyć:

wytluszczenie dat przy czasopismach - brak tego w pozycjach: 7, 10, 18, 29, 36, 128;

oprócz pozycji 80, w całym piśmiennictwie na pierwszym miejscu jest nazwisko autora, a po nim pierwsza litera imienia.

Za wyjątkiem nielicznych błędów, niniejsza dysertacja została napisana poprawną polszczyzną, a przedstawione uwagi w żaden sposób nie umniejszają merytorycznej wartości rozprawy. Reasumując, przedstawiona mi do oceny rozprawa jest pracą bardzo wartościową. Należy podkreślić, że Doktorantka włożyła bardzo wiele wysiłku w jej wykonanie. Opisane w przedstawionej recenzji uchybienia w niczym nie umniejszają wartości merytorycznej prezentowanej pracy. Staranne omówienie wyników poparte bardzo szeroką bazą piśmiennictwa badań innych autorów, wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki. Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnej pracy naukowej, w sposób zwięzły przedstawiła wyniki własnych, bardzo szeroko zakrojonych badań i wysnuła logiczne wnioski, dlatego pracę oceniam bardzo wysoko.

W podsumowaniu chciałabym stwierdzić, że rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Marii Opackiej spełnia 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. z 2017r poz.1789 oraz z 2016r poz. 1586 ze zm.). W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

