



Recenzja *Parytyna*
Przewodnicząca
Rady Dyscypliny Nauki Medyczne
Wojciechowska
dr hab. Katarzyna Sierakowska, prof. UMK

**Zakład Histologii i Embriologii
UMB
ul. Waszyngtona 13
mail: histolog@umb.edu.pl**

**Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Ekspresja cykliny Y w
wybranych liniach nowotworowych po indukcji śmierci komórki”**

Autorstwa mgr Aleksandry Marii Opackiej

Wykonanej pod kierunkiem dr hab. n. med. Agnieszki Żuryń, prof. UMK
(promotor) i dr n. med. Adriana Krajewskiego (promotor pomocniczy).

Nowotwory złośliwe, są po chorobach układu krążenia drugą przyczyną zgonów w Polsce. Kancerogeneza jest procesem wieloetapowym, w którym konsekwencja zmian molekularnych doprowadza do genetycznych i morfologicznych aberracji. Pomimo licznych badań opartych na nowoczesnych technologiach, podstawy procesu kancerogenezy w nowotworach złośliwych, wciąż nie są wyczerpująco poznane. Materiał genetyczny komórek, poddanych ekspozycji na czynniki kancerogenne, często ulega uszkodzeniom. W sytuacji kiedy uszkodzenia DNA mają rozległy charakter lub ich naprawa jest niemożliwa, komórka aktywuje odpowiednie mechanizmy, kierując się na szlak apoptozy, czyli zaprogramowanej śmierci. Proces apoptozy zabezpiecza organizm przed niekontrolowanym rozwojem tkanki nowotworowej. Niewydajne lub mało efektywne komórkowe układy naprawy DNA, mogą doprowadzić do utrwalenia powstających uszkodzeń w postaci mutacji. Komórki, w których doszło do nagromadzenia wystarczającej ilości krytycznych mutacji DNA, uciekają od kontroli mechanizmów wzrostu, proliferacji oraz różnicowania, wchodząc na drogę transformacji nowotworowej. Cykl komórkowy regulowany jest przez szereg białek wśród których, zasadniczą rolę odgrywają cykliny i cyklinozależne kinazy. Udział zaburzeń ekspresji białek regulatorowych w powstawaniu nowotworów jest niezaprzeczalny. Biorąc pod uwagę powiązanie ekspresji cyklin z procesem nowotworzenia, badanie mechanizmu regulatorowego białek związanych z cyklem komórkowym jest niezwykle istotne. Dlatego też temat omawianej pracy doktorskiej jest w pełni zasadny.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Mgr Aleksandry Marii Opackiej, pt. „Ekspresja cykliny Y w wybranych liniach nowotworowych po indukowanej śmierci komórki”, to obszerne opracowanie naukowe, liczące łącznie 183 strony, podzielone na typowe dla dysertacji doktorskich rozdziały, tj. : „Wykaz skrótów” – 4 strony, „Wstęp” – 28 stron, „Cel i założenia pracy” – 2 strony, „Materiały i metody” – 7 stron, „Wyniki” – 102 strony, „Dyskusja” – 12 stron, „Wnioski” – 1 strona, „Streszczenie w wersji polskiej i angielskiej” – po 2 strony, „Piśmiennictwo” – 13 stron, 154 pozycje, „Uchwała Komisji Bioetycznej”. Praca zawiera łącznie 77 rycin, 24 tabele i 25 wykresów. Pragnę zaznaczyć, iż pomimo ogromnej ilości danych i uzyskanych wyników, ryciny, wykresy i tabele mają przejrzystą formę graficzną. Uwagę zwraca także ich niezwykła staranność.

„Wstęp” pracy to rzetelne i wnikliwe przedstawienie faktów, związanych z przedmiotem rozprawy doktorskiej. Autorka w logicznym wywodzie przedstawia: 1) podstawową wiedzę dotyczącą raka płuca z uwzględnieniem czynników epidemiologicznych, charakteryzuje także dwie linie komórkowe NDRP A549 iH1299, 2) cykl komórkowy i jego regulację, szczegółowo opisując cyklinę Y i jej rolę biologiczną, 3) rodzaje śmierci komórki, 4) charakterystykę cisplatyny i 5) charakterystykę ikarytyny. Autorka we „Wstępie” zapoznaje czytelnika z aktualnym stanem wiedzy na temat cyklu komórkowego i jego regulacji. Omawia cyklinę Y i jej znaczenie w szeregu procesów takich, jak np.: autofagia, spermatogeneza, szlaki sygnałowe, czy adipogeneza. W dalszej części Doktorantka charakteryzuje typy śmierci komórki, uwzględnia cechy morfologiczne komórek podlegających tym procesom oraz ich cechy biochemiczne. „Wstęp” kończy podrozdział dotyczący cisplatyny, stosowanej w chemioterapii oraz ikarytyny, która może być w przyszłości wykorzystana w terapii przeciwnowotworowej. Z obszernej literatury Doktorantka właściwie wyselekcjonowała i zacytowała odpowiednie pozycje piśmiennictwa. „Wstęp” napisany jest w sposób jasny, komunikatywny. Część teoretyczna jest doskonałym uzasadnieniem dla podjętych celów badań. Ta część dysertacji wskazuje także, na doskonałe teoretyczne przygotowanie Autorki do realizacji zaplanowanych badań.

Autorka po krótkim uzasadnieniu formułuje główny cel badań, którym było określenie wpływu wzrastających dawek cisplatyny i ikarytyny na przeżywalność, morfologię, cykl komórkowy, potencjał migracyjny komórek, rodzaj indukowanej śmierci komórek oraz na ekspresję cykliny Y w liniach komórkowych

NDRP A549H1299. Cel główny był realizowany w oparciu o 8 następujących zadań szczegółowych: 1) ocenę przeżycia komórek za pomocą testu MTT, 2) analizę morfologii komórek barwionych hematoksyliną wg Mayera, 3) ocenę cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, 4) ocenę testu tworzenia kolonii, 5) ocenę migracji komórek, 6) ocenę rodzaju indukowanej śmierci komórek, 7) ocenę ekspresji cykliny Y, białka RRM2, β – kateniny za pomocą cytometru przepływowego, 8) ocenę ekspresji cykliny Y w mikroskopie fluorescencyjnym. Wymienione cele uzupełniały dwa zadania dodatkowe oceniające tempo migracji komórek z zastosowaniem mikroskopu kontrastowo – fazowego oraz oceniające proces powstawania kryształów.

Mgr Aleksandra Maria Opacka chcąc uzyskać odpowiedź na postawiony cel badań, wykorzystwała komórki niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549 i H1299. Warunki hodowli zostały szczegółowo opisane w rozdziale „Materiały i metody”. Autorka następnie przedstawia metody badawcze wykorzystane w czasie realizacji części eksperymentalnej doktoratu. Na wyróżnienie zasługuje ich trafny wybór i fachowa metodyka, co zapewniło uzyskanie przez Doktorantkę w pełni wiarygodnych wyników badań. Autorka prawidłowo wykonała analizę statystyczną wyników badań, co świadczy o dobrym przygotowaniu naukowym i merytorycznym. Mgr Aleksandra Maria Opacka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy na przeprowadzenie badań.

Uzyskane wyniki badań Autorka opisała w odrębnym rozdziale „Wyniki”, którego schemat jest typowy dla publikacji naukowych. W pierwszej kolejności Doktorantka opisuje wpływ cisplatyny i ikarytyny na przeżycie komórek linii komórkowych NDRP wykorzystanych w badaniach. Dalej, ocenia morfologię komórek, cykl komórkowy, zdolności migracyjne. Następnie Doktorantka opisuje wpływ zastosowanych związków na ekspresję cykliny Y do czego wykorzystwała dwie metody. Uzyskane wyniki pokazują, że czas, rodzaj stosowanego związku i jego stężenie, wpływają na wzrost ekspresji badanej cykliny Y. Autorka wykazała wpływ cisplatyny i ikarytyny na wzrost ekspresji białka RRM2 i β -kateniny. Realizując badania dodatkowe, Doktorantka zauważyła wewnątrzkomórkowe tworzenie się kryształów ikarytyny. Związek ten, jako potencjalny lek w terapii nowotworowej, jest w trakcie badań klinicznych. Fakt tworzenia kryształów wskazuje na efekty uboczne jego stosowania. Rozdział „Wyniki” zawiera liczne ryciny, tabele i wykresy, które w znaczący sposób umożliwiają jasny odbiór tak dużej ilości wyników.

Obszernie cytowana literatura we „Wstępie” i w „Dyskusji” wskazuje na słuszność podjęcia wybranej tematyki badawczej.

Autorka rozpoczyna dyskusję uzasadnieniem, dlaczego w swoich badaniach skupia się na badaniu wpływu wzrastających dawek cisplatyny i ikarytyny na przeżywalność, morfologię, cykl komórkowy, potencjał migracyjny komórek, rodzaj indukowanej śmierci komórek oraz ekspresję cykliny Y w liniach komórkowych A549 i H1299. Doktorantka prawidłowo konfrontuje wyniki własnych badań z dostępną literaturą. Podkreśla podobieństwa i różnice własnych wyników z osiągnięciami literaturowymi innych autorów. Autorka odnosi się także do wyników badań w innych nowotworach. Rozdział ten jest przygotowany merytorycznie i niezwykle rzeczowo.

Dyskusję kończy podsumowanie wyników badań dodatkowych, wskazujących na zagrożenie stosowania ikarytyny w terapii przeciwnowotworowej, ze względu na powstawanie kryształów wewnątrzkomórkowych.

Na podstawie analizy uzyskanych wyników Mgr Aleksandra Maria Opacka sformułowała 5 wniosków, które w pełni odpowiadają na postawione wyjściowo cele i założenia.

Rozdział „Piśmiennictwo” zawiera 154 fachowo dobrane pozycje literaturowe. Zdecydowana ich większość pochodzi z ostatnich lat.

Podsumowując, rozprawa doktorska Mgr Aleksandry Marii Opackiej „Ekspresja cykliny Y w wybranych liniach nowotworowych po indukcji śmierci komórki” nie wykazuje najmniejszych uchybień merytorycznych. Temat rozprawy jest ważny a wyniki są uzupełnieniem dotychczasowej wiedzy i mogą się przyczynić do polepszenia, zarówno diagnostyki, jak i leczenia chorób nowotworowych.

Stwierdzam, że praca Mgr Aleksandry Marii Opackiej, pt. „Ekspresja cykliny Y w wybranych liniach nowotworowych po indukcji śmierci komórki”, spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone w aktualnie obowiązujących przepisach prawa (Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce). W związku z powyższym wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu o dopuszczenie Mgr Aleksandry Marii Opackiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Z poważaniem

KIEROWNIK
Zakładu Histologii i Embriologii

prof. dr hab. Wiesława Ewa Niklińska