

Keceny's pozycjon

Przewodnicząca
Rady Dyscypliny Nauki Medyczne
K. Sierakowska
dr hab. Katarzyna Sierakowska, prof. UMK



Uniwersytet Medyczny

im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Instytut Biostrukturalnych Podstaw Nauk Medycznych

Zakład Histologii i Embriologii

dr hab. Agnieszka Malińska

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Marii Opackiej

pt.: „Ekspresja cykliny Y w wybranych liniach nowotworowych po indukcji śmierci komórki”.

Leland H. Hartwell, Timothy Hunt i Paul Nurse - pionierzy badań molekularnych mechanizmów regulujących przebieg cyklu komórkowego. Nie sposób, przy okazji recenzji niniejszej rozprawy doktorskiej, nie wspomnieć laureatów nagrody Nobla z 2001 roku z dziedziny fizjologii i medycyny. Ich badaniom zawdzięcza się bowiem identyfikację białkowych kinaz serynowo-treoninowych, nazywanych kinazami cyklinozależnymi, ze względu na regulację ich aktywności przez specyficzne białka - cykliny. Kinazy te okazały się następnie być niezbędne dla prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego. Klasyczne już stały się wprowadzone przez Hartwella pojęcia START i punkty kontrolne cyklu. Wskazują one na znaczenie w regulacji proliferacji komórek konieczności zintegrowania wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych sygnałów i precyzyjnego monitorowania gotowości komórek do przejścia ich w kolejną fazę cyklu po prawidłowym zakończeniu fazy poprzedzającej. W uzasadnieniu Komitet Noblowski stwierdził: "Tegoroczni laureaci w dziedzinie medycyny i fizjologii dokonali inspirujących odkryć dotyczących kontroli cyklu komórkowego. Zidentyfikowali kluczowe białka, które regulują cykl komórkowy u wszystkich eukariotycznych organizmów. Te fundamentalne odkrycia wniosły ogromny wkład w poznanie wszystkich aspektów wzrostu komórki. Defekty w podziałach komórki mogą prowadzić do rozwoju procesu nowotworowego. Odkrycia te mogą zatem w dłuższej perspektywie otworzyć nowe możliwości w terapii raka".

Idea badań będących podstawą rozprawy doktorskiej i zdefiniowana w tytule jest niezwykle interesująca i doskonale wpisuje się w aktualne trendy a jednocześnie nosi na sobie miano badań

JMC

nowatorskich - choć nieprawidłowy poziom ekspresji cyklin wykazano w komórkach wielu rodzajów nowotworów złośliwych, to podkreślić należy, iż niewiele badań związanych jest z molekularnym mechanizmem aktywności wybranej przez Doktorantkę cykliny Y. Podkreślenia wymaga również fakt, iż rozszyfrowanie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw indukcji śmierci komórek nowotworowych, a zwłaszcza apoptozy jest najbardziej pożądanym oczekiwaniem terapii onkologicznej. W chorobach nowotworowych, bowiem, w wyniku nadekspresji czynników antyapoptotycznych i obniżonej aktywności białek proapoptotycznych, obserwuje się zaburzenia procesu apoptozy, co pozwala na kontynuowanie proliferacji komórek pomimo uszkodzenia genomu. W modelach in vitro wielokrotnie udowodniano, że nadekspresja cyklin może z jednej strony promować apoptozę z drugiej zaś stymulować proliferację komórek. Dlatego też uważam, że podjęcie próby wyjaśnienia korelacji poziomu ekspresji cykliny Y z indukowaną cytostatykami śmiercią komórek wybranych linii nowotworowych, ma dużą wartość nie tylko poznawczą, ale mającą znaczący wkład w zwiększenie poziomu wiedzy dotyczącej wdrożenia nowatorskich terapii w dziedzinie onkologii.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 184 strony maszynopisu i ma układ typowy dla prac eksperymentalnych.

Rozprawa rozpoczyna się przejrzystym sformatowanym **Spisem treści, Wykazem skrótów** i akronimów stosowanych w dalszej części dysertacji oraz **Wprowadzeniem** w którym autorka zwięźle argumentuje zasadność podjętego zagadnienia badawczego podkreślając rolę zaburzeń poziomu ekspresji białek regulatorowych w procesie kancerogenezy.

We **Wstępie** liczącym 28 stron i stanowiącym pierwszy rozdział dysertacji Doktorantka charakteryzuje zagadnienia stanowiące fundament problematyki badawczej. W przystępny i komunikatywny sposób omówione są w nim zagadnienia niezbędne dla zrozumienia celów rozprawy, oraz architektury metodologicznej prowadzonych badań. Układ treści w rozdziale uważam za logiczny, a poszczególne zagadnienia zostały prawidłowo wyselekcjonowane z dostępnej literatury naukowej.

Następnie Doktorantka zdefiniowała **cel**, będący trzonem prowadzonych przez Nią badań i scharakteryzowała **metody badawcze**. Na uznanie zasługuje bardzo złożony warsztat metodyczny Doktorantki. Uważam, że Doktorantka wykazała się ponadprzeciętną umiejętnością wyboru i łączenia technik badawczych. Na tej podstawie mogę stwierdzić, że w stopniu bardzo dobrym opanowała warsztat badawczy, wymagający dużego nakładu pracy.

Dobór właściwych metod badawczych zapewnił Autorce przeprowadzenie kompleksowych badań, które umożliwiły Doktorantce uzyskanie opisanych w kolejnym rozdziale **Wyników**.

W rozdziale **Dyskusja** będącym omówieniem znaczenia uzyskanych wyników, autorka umiejętnie konfrontuje je z rezultatami udokumentowanymi w literaturze naukowej. Rozdział ten jest podsumowaniem całości danych doświadczalnych, wobec czego Doktorantka w naturalny sposób

odwołuje się do uzyskanych przez siebie wyników uzupełniając treść o trafną ich analizę i spójny komentarz.

Kolejnym rozdziałem dysertacji są **Wnioski**, które pomimo tego, są odzwierciedleniem przeprowadzonych przez Doktorantkę badań, w moim odczuciu wymagają korekty redakcyjnej.

Ostatnie dwa rozdziały rozprawy doktorskiej to **Streszczenie** opracowane w języku polskim i angielskim zwięźle podsumowujące zagadnienie badawcze stanowiące oś niniejszej dysertacji.

Bibliografia liczy 154 pozycji przedstawiających zagadnienia związane ściśle z tematyką badań prowadzonych przez Doktorantkę. Ponad 40% cytowań odnosi się do najnowszych danych literaturowych z ostatnich 7 lat. Zaledwie jedna pozycja to odnośnik polskojęzyczny, co świadczy nie tylko o biegłej znajomości terminologii anglojęzycznej Doktorantki, ale również o swobodnym korzystaniu z baz danych i krytycznym doborze źródeł.

Dalsza część recenzji dotyczyć będzie uwag i wątpliwości, jakie zrodziły się podczas lektury rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Marii Opackiej. Ich zdefiniowanie jest jedynie dowodem na fakt, iż temat podjęty przez Doktorantkę, panel metodologiczny i dyskusja otrzymanych wyników była niesłychanie interesującą i inspirującą lekturą, a uwagi poczyniono wyłącznie w kontekście planowanego zapewne przygotowania artykułu naukowego.

1. Zgodnie z zasadami redakcji tekstów, w wierszach tekstu, które liczą powyżej 40 znaków, nie należy pozostawiać na końcu wiersza jednoliterowych spójników i przyimków. W tekście dysertacji zawieszki pojawiają się dość często.
2. Myślę, że należałoby również ujednoczyć zapis separatora dziesiętnego. Zgodnie z polskimi zwyczajami typograficznymi część dziesiętną oddziela się przecinkiem.
3. Na stronie 12 dysertacji pojawia się sformułowanie „wysoka ilość zgonów”. Z uwagi na fakt, iż określenia „ilość” używamy w odniesieniu do rzeczowników niepoliczalnych, zasadne wydaje się użycia określenia „liczba zgonów”.
4. Na stronie 16 jako przykład komórek powracających do fazy G1 Autorka podaje limfocyty. Sądzę, że warto byłoby uściślić, iż cecha ta dotyczy wyłącznie populacji limfocytów pamięci immunologicznej.
5. Doktorantka w treści wstępu (strona 19) niezwykle wnikliwie opisuje charakterystykę funkcjonowania i znaczenia punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Stało się to zapewne powodem dla którego analizując tekst odczułam niedosyt wynikający z pominięcia punktu kontrolnego fazy M weryfikującego właściwe sparowanie chromosomów, ich odpowiednią lokalizację czy też właściwą strukturę wrzeciona.
6. Na stronie 19 wstępu Doktorantka używa określenia „prawidłowa ekspresja cyklin”. Domyślałam się, że dotyczy to prawidłowego poziomu ekspresji tych białek. Na tej samej stronie Autorka stosuje terminologię „normalna komórka”. Jako Naukowiec, Doktorantka przywykła zapewne do anglosaskiej nomenklatury, stosującej określenie „normal cell, normal tissue”. Pamiętajmy jednak, że przymiotnikiem, który w bardziej trafny sposób tłumaczy przytoczone sformułowania jest przymiotnik „prawidłowa”.
7. Tekst rozprawy doktorskiej wzbogacony jest wieloma rycinami, które w fenomenalny sposób wzbogaciłyby merytorycznie treść kolejnych rozdziałów. Jednakże, do żadnego

z nich nie odnalazłam przywołania w tekście rozprawy. Ponadto, w przypadku niektórych rycin Autorka pomija źródła, jakie wykorzystwała do ich przygotowania.

8. Kolejna uwaga dotycząca rycin to pozostawienie w nich angielskich opisów (Ryc.7, Ryc.8, Ryc.9).
9. Jako morfolog reprezentujący starą szkołę redakcji tekstów naukowych, przywykłam do traktowania rycin jako autonomicznych elementów publikacji naukowych. I być może moja uwaga trąci myszką, ale nawet najbardziej wartościowa merytorycznie dokumentacja opatrzona skąpym opisem, tak jak chociażby w przypadku ryciny 4 „Komórki linii H1299. A – Zdjęcie po 24 godzinach hodowli. B – Zdjęcie po 48 godzinach hodowli. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego z kamerą OLYMPUS oraz aplikacji EPviewTM (badania własne), powoduje, że czytelnik zmuszony jest do samodzielnej interpretacji zaprezentowanej dokumentacji. Jest to trudne i obciążone ryzykiem subiektywizmu osoby analizującej dany obraz. Tym bardziej, że tak, jak wspomniałam powyżej, żadna z rycin nie jest przytoczona w tekście. W przypadku ryciny 18 – 25, nie podano metody barwienia.
10. Opis ryciny 7 „Miejsce łączenia cykliny z cyklem komórkowym odpowiada najwyżej ekspresji cykliny” wymaga niewielkiego przereklamowania. Żadna z cyklin nie łączy się z cyklem komórkowym. Strzałka wskazuje najwyższy poziom ekspresji danej cykliny.... Może tak byłoby nieco bardziej trafnie?
11. Skale. Brak w opisach dokumentacji, co jest już rutynowym wymogiem redakcyjnym każdego czasopisma naukowego. Proszę również zauważyć, iż skala umieszczona na dokumentacji fotograficznej zawsze powinna być czytelna i umieszczona na każdej fotografii. Nawet jeśli fotografia jest elementem setu dokumentacyjnego.
12. W opisie ryciny 16 Autorka literą „C” oznaczyła komórkę, którą opisała jako reprezentanta początkowej fazy podziału (zakładam, że komórkowego). Analiza dokumentacji wydaje się prowadzić do wniosku, iż komórka ta jest uchwycona w pięknej metafazie. Doskonała jakość zaprezentowanej przez Autorkę dokumentacji fotograficznej pozwala mi dostrzec płytkę metafazalną, będącą bezdyskusyjnym markerem morfologicznym metafazy. Tożsama uwaga dotyczy ryciny 17, 26.
13. W opisach dokumentacji oraz w tekście rozdziału Wyniki Autorka posługuje się pojęciami „powiększona komórka”, „powiększone jądro komórkowe”. Moje pytanie: powiększone względem czego? Innych komórek tej samej linii czy może względem komórek z grupy kontrolnej? Wyniki pomiarów morfometrycznych pozbawiłyby nas szans na dyskusję rozwiewając wszelkie wątpliwości, ale z uwagi na ich brak ... na jakiej podstawie wnioskujemy o większym rozmiarze komórek? Obserwacje mikroskopowe są niejednokrotnie wystarczające, zwłaszcza dla doświadczonego badacza, ale dla czytelnika niekoniecznie. Sądzę, że Autorce zdecydowanie łatwiej byłoby przekonać czytelnika do trafności wysnutych wniosków, gdyby dokumentacja dotycząca zmian morfologii komórek została przedstawiona w setach fotograficznych, lub wyniki zostałyby wzbogacone o proste analizy morfometryczne (uśredniona wielkość komórek linii kontrolnej versus uśredniona wielkość komórek po podaniu leku).
14. Interpretację dokumentacji przedstawiającej wyniki analiz przeprowadzonych z wykorzystaniem cytometru przepływowego znacząco utrudniał fakt, iż Autorka nie zaznaczyła do której fazy cyklu odnosi się dany wykres. W opisie ryciny pojawia się „ilość komórek”. Tę, zdaje się, mamy możliwość policzyć. Ponadto w opisach ryciny 42 i 44

- Autorka stosuje sformułowanie „zmiany w ilości komórek linii A549 w poszczególnych populacjach śmierci komórki”. Czy jest to językowy lapsus?
15. Czy stosowane przez Autorkę pojęcie „prędkość komórek” jest tożsame z tempem ich migracji? Jeśli tak, to pomimo chęci unikania powtórzeń terminologicznych, sugerowałabym unikania pojęcia prędkość. Zwłaszcza w nagłówkach tabel.
 16. W opisie wykresu 14 i 15 oraz w tabeli 18 Autorka stosuje pojęcia „wczesna i późna apoptoza, nekroza”. W tekście rozdziału opisującego metody badawcze nie dostrzegłam opisu i charakterystyki kryteriów morfologicznych na podstawie których Doktorantka klasyfikowałaby wyżej wspomniane stadia. Jakimi zatem się posłużono?
 17. Dokumentacja wyników barwienia fluorescencyjnego z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego jest niezwykle wartościowa. Jednakże w opisie rycin (46-55) nie podano niezbędnej do interpretacji obrazu legendy. Który barwnik (kolor) stanowił marker jądra komórkowego, który barwnik (kolor) jest indykátorem poziomu ekspresji cykliny Y? Ponadto w treści opisu ryciny pojawia się zdanie, które, w mojej opinii stanowi wniosek dokonanych obserwacji. W rozdziale wyniki, nie powinno mieć to miejsca.
 18. Z uwagi na wymogi redakcyjne większości czasopism naukowych sugeruję umieszczanie tytułów tabel nad tabelą, nie zaś pod nią.
 19. Moje zastrzeżenia budzi tytuł rozprawy. Sugerując się tytułem, z nieskrywaną niecierpliwością oczekiwałam wyników badań przeprowadzonych na „wybranych liniach nowotworowych”. Analiza zamknęła się na dwóch liniach komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuca. Nie twierdzę, że zmniejsza to wartość pracy, hipotezy badawczej, czy uzyskanych wyników, jednakże należałoby (mimo trudności formalnych towarzyszących zmianie tytułu rozprawy) zadbać o to, by tytuł korespondował ściślej z treścią rozprawy.
 20. W definicji celu pracy Autorka oświadcza: „Celem badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej było określenie wpływu wzrastających dawek cisplatiny i ikarytyny na przeżywalność, morfologię, cykl komórkowy, potencjał migracyjny komórek, rodzaj indukowanej śmierci komórek oraz ekspresję cykliny Y w liniach komórkowych A549 i H1299. i H1299” Czy zatem tytuł odzwierciedla tylko jeden z celów przeprowadzonych badań?
 21. Nie dostrzegam zasadności definiowania zadań szczegółowych rozprawy, tym bardziej, że większość z nich stanowi powtórzenie treści celu głównego wzbogaconą jedynie o aspekty metodologiczne.
 22. Ogólnie przyjętą zasadą redagowania rozprawy doktorskiej jest założenie, iż wnioski powinny bezpośrednio korespondować z postawionymi przez Doktorantkę celami badawczymi. Analiza treści pracy w kontekście powyższego założenia wykazuje, że bez jasno sformułowanej odpowiedzi pozostają dwa cele dotyczące określenia wpływu wzrastających dawek cisplatiny i ikarytyny na cykl komórkowy i rodzaj indukowanej śmierci komórki.
Ponadto, sposób sformułowania wniosku powinien w moim odczuciu być bardziej jednoznacznym uogólnieniem treści zawartych w wynikach a nie ich powtórzeniem.
 23. Ostatnia uwaga dotyczy warunków prowadzenia hodowli. Zdaję sobie sprawę, iż prowadzenie przez Doktorantkę hodowli w warunkach 2D miało swoje uzasadnienie. Jednakże z uwagi na bezdyskusyjny wpływ mikrośrodowiska i komórek podścieliska na kierunek przebiegu i regulację mechanizmów molekularnych leżących u podstaw progresji

choroby nowotworowej, rezygnacja z hodowli w warunkach 3D powinna być opatrzona komentarzem i stosownym uzasadnieniem.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Aleksandry Marii Opackiej pt. "Ekspresja cykliny Y w wybranych liniach nowotworowych po indukcji śmierci komórki" nosi na sobie miano oryginalnego problemu naukowego. Doktorantka w treści dysertacji wykazała się znajomością tematyki badawczej oraz umiejętnością interpretacji uzyskanych wyników. Architektura metodologiczna na której Doktorantka oparła tezę badawczą w znaczący sposób podnosi wiarygodność uzyskanych wyników. Wyniki otrzymane przez Doktorantkę otwierają dalsze perspektywy badawcze oraz aplikacyjne. Chciałabym podkreślić, iż większość przedstawionych przeze mnie uwag ma jedynie charakter polemiczny. Nie umniejszają one wartości naukowej dysertacji a dotyczą głównie sposobu prezentacji wyników i powinny być traktowane jedynie jako sugestia, którą Autorka może wykorzystać podczas publikacji wyników badań w przyszłości.

Oświadczam, iż rozprawa doktorska mgr Aleksandry Marii Opackiej pt. "Ekspresja cykliny Y w wybranych liniach nowotworowych po indukcji śmierci komórki" spełnia warunki 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 oraz z 2016 r. 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.

Jednocześnie pragnę złożyć wniosek 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.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Agnieszka Jolanta".