



UNIWERSYTET MEDYCZNY
W BIAŁYMSTOKU



ZAKŁAD ANATOMII PRAWIDŁOWEJ CZŁOWIEKA

Kierownik: Prof. dr hab. Janusz Dzieciot

15-230 Białystok
ul. Mickiewicza 2A
skr. pocztowa 15

tel. (+48) 85 748 5661
tel/fax. (+48) 85 748 5664
e-mail: anatomia@umb.edu.pl

Białystok, 27.05.2015 roku

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Patrycji Wizińskiej

„Optymalizacja procesu przygotowania materiału tkankowego z wykorzystaniem metody mikrodysekcji laserowej do badań z zakresu biologii molekularnej”

Wczesne rozpoznanie i rozpoczęcie leczenia choroby nowotworowej jest podstawą dobrego rokowania dla pacjenta. Jeszcze do niedawna podstawowym badaniem diagnostycznym nowotworów złośliwych, decydującym o rozpoczęciu leczenia, było badanie histopatologiczne. Doświadczenie patomorfologa decydowało o określeniu typu nowotworu złośliwego i jego stopniu złośliwości. Rozpoznanie histopatologiczne było podstawą doboru leczenia onkologicznego. W części przypadków efekt terapeutyczny był znacznie niższy od oczekiwanego. Badania doświadczalne i kliniczne wykazały, że o biologii nowotworu decyduje nie tylko obraz mikroskopowy, ale także jego profil genetyczny. W chwili obecnej coraz częściej dobór leczenia uzależniony jest nie tylko od wyników badań morfologicznych, ale także od wyników badań molekularnych.

Właściwe zabezpieczenie materiału tkankowego do badań zarówno histopatologicznych jak i molekularnych jest podstawą uzyskania obiektywnych wyników prowadzonych badań. Miejsce pobrania materiału, sposób i czas utrwalenia, przestrzeganie protokołu badania ma niezwykle istotny wpływ na końcowe rozpoznanie zmiany nowotworowej, a w konsekwencji dobór leczenia.

Podjęty przez doktorantkę temat badawczy dotyczący optymalizacji procesu przygotowania materiału tkankowego z wykorzystaniem metody mikrodysekcji laserowej do badań z zakresu biologii molekularnej jest więc bardzo aktualny. Dotyczy on bowiem

problemu ścisłej współpracy patomorfologa z biologiem molekularnym. Temat jest szczególnie interesujący, bowiem większość opracowań naukowych koncentruje się na ocenie profilu genetycznego wybranego materiału tkankowego i zastosowaniu określonej metody badawczej. Tylko nieliczne prace przedstawiają trudności w doborze metod wykorzystywanych do badań w zakresie biologii molekularnej oraz starają się wykazać modyfikacje służące poprawie jakości uzyskanych wyników.

Autorka we wstępie swojej pracy szczegółowo przedstawiła znaczenie właściwego doboru materiału do badań molekularnych. Wskazała na wpływ zewnętrznych rybonukleaz na destabilizację endogennego RNA i na konieczność zachowania szczególnego reżimu laboratoryjnego przy pozyskiwaniu materiału genetycznego. Uwidoczniła trudności w ocenie RNA z uwagi na niewielką jego ilość w materiale tkankowym. Dotyczy to szczególnie badań z wykorzystaniem mikrodysekcji laserowej.

We wstępie doktorantka w sposób uporządkowany i przejrzysty przedstawiła także metody służące do określenia ilości i jakości RNA, wskazując na zalety i wady poszczególnych metod badawczych. Wady związane były głównie z koniecznością posiadania materiału RNA o większym stężeniu. Zaletami była automatyzacja badań umożliwiająca przedstawienie wyników w formie wartości liczbowych np. RIN. Wyniki badań uzyskane w tej formie mogą być porównywane i poddane obiektywnej analizie statystycznej. W tej części pracy Patrycja Wizińska podkreśliła rolę jakości pozyskanego RNA wskazując na konieczność prowadzenia badań w oparciu o materiał homogeny. Do jego uzyskania służy Mikrodysektor laserowy MMI CellCut Plus, który wykorzystwała do uzyskania materiału do badań własnych.

Doktorantka swoje badania przeprowadziła na komórkach raka jelita grubego. Dzięki zastosowaniu mikrodysekcji laserowej uzyskała niezmięcone, homogenne komórki zarówno pod względem morfologicznym jak i biochemicznym. Przed przesłaniem pracy do druku proponuję umieszczenie w charakterystyce grupy badanej stopnia złośliwości histologicznej (G) badanych raków.

Autorka pracy jako główny cel swoich badań założyła optymalne przygotowanie preparatów do badań metodą mikrodysekcji laserowej oraz wypracowanie procedury uzyskania jak najlepszej jakości RNA z komórek raka jelita grubego. Zamierzała ten cel osiągnąć poprzez realizację przedstawionych w kolejnym rozdziale trzech celów szczegółowych. Mają one służyć optymalizacji kontroli jakości oraz stężenia RNA w małych próbkach badanych na płytках LabChip z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej, optymalizacji izolacji RNA z małych próbek z materiału mrożonego i optymalizacji jego wykorzystania do mikrodysekcji laserowej.

Założone cele badań doktorantka realizowała w oparciu o materiał i metody przedstawione w kolejnym rozdziale pracy. W rozdziale tym w sposób bardzo szczegółowy przedstawiła zestaw służący do izolacji całkowitego RNA i opisała kolejne etapy opracowania materiału od ekstrakcji RNA do izolacji, z uwzględnieniem modyfikacji własnej – podwójnej elucji. Zrozumienie niezwykle skomplikowanych procedur laboratoryjnych ułatwiają przejrzyste schematy. W rozdziale tym Doktorantka przedstawiła także metody ilościowego i jakościowego określenia pozyskanego RNA z wykorzystaniem spektrofotometru i bioanalyzera, zakresów, precyzji i błędów pomiaru stężenia RNA i współczynnika RIN oraz porównanie metod służących do pomiaru stężenia RNA. Opisała także sposób określenia wpływu denaturacji RNA na efekt prowadzonych badań i optymalizację protokołu do izolacji RNA po mikrodysekcji laserowej. Zastosowała w tym celu osiem różnych protokołów do izolacji RNA. Ich szczegółowy opis przedstawiła w tekście pracy. Dodatkowo wykorzystwała także różne metody barwienia preparatów przy przygotowaniu preparatów do mikrodysekcji laserowej: hematoksyliny i eozyny, fioletu krezyłowego i zestawu o nieujawnionym przez producenta składzie.

Przedstawione w tym rozdziale metody statystyczne wykorzystane do opracowania zgromadzonego materiału zostały dobrane w sposób właściwy i przyczyniły się do właściwego opracowania uzyskanych danych liczbowych i wyciągnięcia wniosków wynikających z uzyskanych wyników.

W oparciu o niezwykle pracochłonne i czasochłonne badania doktorantka uzyskała wyniki, które przedstawiła w kolejnym rozdziale pracy. Umieszczone w pracy tabele i ryciny ułatwiają czytającemu zrozumienie wyników uzyskanych poprzez zastosowanie poszczególnych metod badawczych. Doktorantka wykazała, że określenie jakości badanego RNA, wyrażone wartością współczynnika RIN, zależy od jego stężenia. Wskazuje to celowość orientacyjnego określenia stężenia RNA przed podjęciem decyzji o doborze zestawu wykorzystywanego do badań z Bioanalyzerem. (wniosek 1). W badaniu tym denaturacja RNA nie ma wpływu na wartość współczynnika RIN. (wniosek 5). Bardzo istotny jest wniosek 6 wskazujący, że modyfikacja własna Doktorantki przy izolacji RNA z mrożonych fragmentów zapewniła najlepszą jakość pozyskanego RNA. Ma to szczególne znaczenie w kontekście wniosku 4, że wartość stężenia RNA zależy od rodzaju aparatury użytej do jego pomiaru. Proponuję wnioski 2 i 3 połączyć w jeden.

Przeprowadzone badania i uzyskane przez Autorkę wyniki pozwoliły na przeprowadzenie w kolejnym rozdziale dyskusji. Doktorantka podkreśliła w nim, że uzyskanie właściwego materiału do badań technikami mikrodysekcji laserowej jest

niezwykle trudne z uwagi na znaczną heterogenność tkanki nowotworowej. Wskazała na konieczność łączenia tej metody z badaniami ekspresji genów. Podkreśliła konieczność eliminacji próbek zawierających zdegradowany RNA w celu uniknięcia pomyłek przy interpretacji poziomu ekspresji badanych genów. Doktorantka, w oparciu o badania własne i wyniki innych autorów, wskazała na konieczność przestrzegania ścisłych kryteriów oceny jakości RNA i wykazała, że współczynnik RIN jest wiarygodnym sposobem na ujednoczenie pomiarów jakości RNA. Szczegółowo przeanalizowała możliwości wystąpienia błędów pomiaru RIN i wskazała na zróżnicowane wyniki uzyskiwane w zależności od zastosowanych protokołów badawczych.

Niezwykle interesujące jest omówienie wyników badań własnych uzyskanych w oparciu o autorski protokół do izolacji RNA z komórek nowotworowych. Uzyskane wyniki dobrze rokują dalszemu rozwojowi naukowemu Doktorantki.

Proponuję przed przesłaniem pracy do druku usunąć z dyskusji części informacji dotyczących metodyki badań do rozdziału poświęconemu temu zagadnieniu oraz usunięcie pierwszego fragmentu dyskusji, którego treść została przedstawiona we wstępie.

Rozprawa doktorska Patrycji Wizińskiej stanowi swoistą pozycję edukacyjną. Dobór tematu i jego uzasadnienie wskazują na doskonałe przygotowanie praktyczne Doktorantki w zakresie biologii molekularnej. Treść wstępu oraz dyskusja, oparte na informacjach pochodzących z piśmiennictwa obejmującego 101 pozycji dowodzi dobrego przygotowania teoretycznego. Uwzględnione w pracy publikacje pochodzą w znacznej części z ostatnich lat.

Stwierdzone w tekście pracy pojedyncze usterki stylistyczne i redakcyjne nie rzutują w istotny sposób na wysokie walory przedstawionej mi do oceny dysertacji. Zaznaczam, że stwierdzone usterki i uwagi zawarte w przedstawionej recenzji wynikają z subiektywnego odczucia jej autora.

Przedstawioną do oceny rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Uzyskane wyniki mają bowiem istotne znaczenie praktyczne. Realizacja zaplanowanych badań wymagała bardzo dużego wkładu pracy. Doktorantka wykazała się gruntowną znajomością tematu i umiejętnością samodzielnego rozwiązywania zadania badawczego.

Rozprawa doktorska Patrycji Wizińskiej spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr65, poz.595, z późn. zm.).

Mam zaszczyt przedstawić Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Patrycji Wizińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Patrycja Wizińska