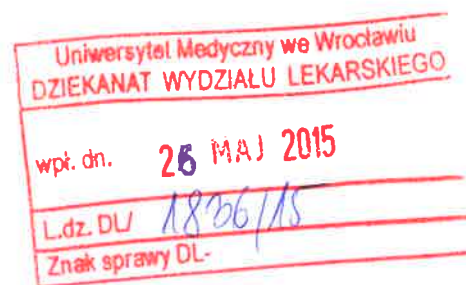


Prof. dr hab. Dariusz Rakus  
Zakład Fizjologii Molekularnej Zwierząt,  
Instytut Biologii Eksperymentalnej  
Uniwersytet Wrocławski,  
ul. Cybulskiego 30  
50-205 Wrocław

Wrocław, 25.05.2015



## OCENA

Rozprawy doktorskiej Pani Patrycji Wizińskiej

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

Podstawowym celem przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej było opracowanie metody przygotowania preparatów histologicznych oraz izolacji RNA do badań przy pomocy qPCR (ilościowego pomiaru ilości odpowiednich mRNA w badanej próbce).

Technika polegająca na pomiarach ilościowych mRNA będących produktem ekspresji odpowiednich genów jest obecnie podstawowym narzędziem badawczym biologii molekularnej oraz ważnym sposobem monitorowania zajścia, lub natężenia, wielu procesów chorobowych; np. typu oraz stadium rozwoju nowotworu. Na obecnym etapie rozwoju wiedzy o procesach chorobowych istotnym jest jednak precyzyjny pomiar ilości mRNA znajdującego się nie w dużym, makroskopowym fragmencie tkanki zmienionej chorobowo, lecz w konkretnych komórkach objętych procesem chorobowym, np. nowotworowym. Od kilku lat istnieje możliwość izolacji tak niewielkich fragmentów tkanki do badań molekularnych (po uprzednim zabiegu operacyjnym) przy pomocy mikrodysekcji laserowej. Do tej pory nie zostały jednak opracowane szczegółowe procedury pozwalające na uzyskanie wysokiej powtarzalności izolacji RNA o odpowiedniej jakości. Standaryzacja taka jest konieczna do zastosowania połączonych technik mikrodysekcji i qPCR jako narzędzia analitycznego.

Doktorantka w swojej pracy podjęła próbę opracowania takiej metody. To zadanie dosyć niewdzięczne, jako że nie wiąże się z odkrywaniem nowych mechanizmów biologicznych, lecz wymaga niezwyklej skrupulatności w wielokrotnie powtarzanych eksperymentach. Efekt takiej pracy, po opublikowaniu, niestety prawdopodobnie nie będzie cytowany zbyt często przez

innych autorów – oni po prostu wykorzystają wiedzę zdobytą przez doktorantkę, co oszczędzi im setki godzin pracy laboratoryjnej i znaczne kwoty pieniężne.

Pocieszeniem dla Doktorantki może być świadomość, że dzięki takim badaniom wykorzystującym RNA izolowane ze skrawków poddanych mikrodysekcji laserowej, qPCR będzie mógł być standartową metodą monitorowania zmian chorobowych i może się przyczynić do uratowania tysięcy istnień ludzkich. Co więcej, poprawność przeprowadzenia badań naukowych wykorzystujących qPCR oraz mikrodysekcję laserową powinna wyeliminować z literatury naukowej ogromną ilość prac przedstawiających błędne wyniki. Zalew takich prac wydaje się obecnie istotnie hamować rozwój nauk biomedycznych, a co najmniej powodować trwonienie ogromnych sum pieniężnych na badania zjawisk nieistniejących.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że praca była realizowana pod kierunkiem Pani Profesor Marzeny Podhorskiej-Okołów w Katedrze Profesora Piotra Dzięgła, którzy to techniki opisywane w rozprawie doktorskiej wykorzystują rutynowo w swojej pracy badawczej i nie powinni być szczególnie zainteresowani w ustanawianiu takich standardów – ich brak pozwala na opublikowanie większej ilości prac, a to jest kryterium decydujące o przyznawaniu funduszy na badania naukowo-rozwojowe w naszym kraju.

Pani mgr Patrycja Wizińska wywiązała się z powierzonego jej zadania doskonale i przedstawiła szereg badań i wniosków z nich płynących, do których dostosowanie się powinno prowadzić do poprawnego wykonania procedury pomiaru ilości odpowiednich RNA (qPCR) z próbek uzyskanych po mikrodysekcji.

W trakcie swoich badań Pani magister zwróciła uwagę na szereg zjawisk i faktów, które często są pomijane przez biologów i lekarzy w ich pracy laboratoryjnej, i tak Doktorantka pokazała, że:

- określenie jakości badanej próbki RNA zależy od jej stężenia,
- pomiary stężeń RNA zależą od użytej metody pomiarowej,
- denaturacja termiczna, poprzez zmianę udziału struktur drugorzędowych, wpływa wartości pomiaru stężenia RNA,
- sposoby barwień skrawków mrożeniowych, które będą poddane procedurze mikrodysekcji, wpływają na jakość RNA

Na podstawie swoich doświadczeń Pani mgr Patrycja Wizińska przedstawiła procedurę uzyskania wysokiej jakości RNA ze skrawków mrożeniowych fragmentów gruczołakoraka, która to powinna zostać zaakceptowana jako procedura standardowa w badaniach ekspresji białek nowotworów jelita.

Podsumowując, oceniam rozprawę doktorską Pani Patrycji Wizińskiej jako bardzo ważną metodologicznie pracę, o potencjalnie bardzo dużej sile oddziaływanie na badania biomedyczne. Mogę mieć tylko nadzieję, że badacze wykorzystujący technikę qPCR połączona z mikrodysekcją uznają za stosowne podporządkowanie się wnioskom płynącym z pracy doktorantki.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska 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. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) oraz stawiam wniosek o dopuszczenie Pani Patrycji Wizińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 25.05.2015



Prof. dr hab. Dariusz Rakus