

wpł 07.09.2017

M. Podhorska-Okołów

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
WYDZIAŁ LEKARSKI
Prodziekan ds. Nauki

Prof. dr hab. Zbigniew Dobrzański

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt

prof. dr hab. Marzena Podhorska-Okołów

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu DZIEKANAT WYDZIAŁU LEKARSKIEGO	
wpl. dnia	07-09-2017
L. dz. DL	3382/17
Znak sprawy DL	

RECENZJA

rozprawy doktorskiej *mgr inż. Renaty Brykner-Ręczkowskiej*

pt.: „Wpływ cystatyny pozyskanej z białka jaj kurzego na wybrane linie komórek prawidłowych i nowotworowych”

promotor: prof. dr hab. Marzena Podhorska-Okołów

Podstawa prawna

- a) Uchwała Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu nr 54/11/2016 z dn. 24 listop. 2016 r.
- b) Zlecenie na wykonanie recenzji z Dziekanatu Wydz. Lekarskiego - nr pisma DL/N/3122/17 z dn. 21.08.2017 r.

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera ogółem 101 ponumerowanych stron. Poszczególne rozdziały to:

1. Wykaz skrótów s. 6 - 7,
2. Wstęp s. 8 - 23 (2 podrozdziały),
3. Cele pracy s. 24 - 25,
4. Materiał i metody s. 26 - 38 (3 podrozdziały),

5. *Wyniki* s. 39 - 68 (2 podrozdziały),
6. *Dyskusja* s. 69 - 76 (2 podrozdziały),
7. *Wnioski* s. 77,
8. *Streszczenie w języku polskim* s. 78 - 79,
9. *Abstract w języku angielskim* s. 80 - 81,
10. *Bibliografia* s. 82 - 96,
11. *Dorobek naukowy* s. 97
12. *Aneks* s. 98 - 101 (patent).

W tekście zawarte są 4 tabele, 4 wykresy, 13 rycin i 4 fotografie. W bibliografii wykazanych jest 127 nieponumerowanych pozycji literatury, przeważnie zagranicznej.

Wszystkie te rozdziały tworzą razem logiczną całość. Oceniana praca zawiera wszystkie elementy rozprawy doktorskiej, ma charakter naukowo-badawczy, napisana jest poprawnym, naukowym językiem i formalnie odpowiada wymogom zawartym w *Ustawie 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.)*.

Praca została wykonana w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (kier. prof. dr hab. Piotr Dzięgieł) w ramach realizacji projektu POIG 01.03.01-00-133/08 pt.: „Innowacyjne technologie produkcji biopreparatów na bazie nowej generacji jaj (OVOCURA)”, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (koordynator: Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu).

Ocena merytoryczna

Wstęp. W rozdziale tym Doktorantka przedstawiła problematykę chorób nowotworowych, które są na drugim miejscu przyczyn śmiertelności ludzi w świecie. Podała dane statystyczne zachorowań na wszystkie rodzaje nowotworów złośliwych w świecie i w Polsce. Dane pochodzą z 2012 r., ale są ogólnie dostępne (internet) też z roku 2015 r., co myślę, uwzględni Autorka przygotowując pracę do publikacji. Następnie przedstawiła historię „narodzin” cystatyn – inhibitorów proteaz cysteinowych, ich podział, budowę chemiczną i właściwości. Opisała ludzką

cystatynę C, jej znaczenie w procesach immunologicznych, aktywność antybakteryjną i przeciwwirusową oraz rolę w uszkodzeniach mózgu (neuroprotekcyną). Opisała krótko rolę cystatyny C w chorobach nowotworowych, również u zwierząt laboratoryjnych. Mogłaby dopisać, iż polipeptyd ten jest już wykorzystywany w diagnostyce medycznej jako marker w chorobach nerek i układu sercowo-naczyniowego. Wyeksponowała natomiast cystatynę pozyskanej z białka jaja kurzego (owocystatyna), chociaż informacji naukowych o tej naturalnej substancji jest niewiele. Jak wiadomo dotychczas, owocystatyna jest silnym i odwracalnym inhibitorem proteaz cysteinowych należących do rodziny papainowej (C1) i leguminazowej (C13). Ze względu na swoje właściwości polipeptyd ten może znaleźć zastosowanie jako aktywny składnik leków (także weterynaryjnych) oraz czynnik konserwujący żywność. Mało jest jednak badań w tym zakresie. Autorka mogłaby wspomnieć w przeglądzie literatury też o innych bioaktywnych składnikach jaja kurzego, które były przedmiotem badań w ramach realizacji projektu OVOCURA.

Generalnie ten ważny rozdział jest poprawnie napisany, dobrze wprowadza w problematykę badań nad tą bioaktywną substancją w warunkach *in vitro*. Doktorantka wykorzystowała dość liczne pozycje piśmiennictwa fachowego, co świadczy o Jej dużej wiedzy biochemicznej i medycznej w przedmiotowym zakresie.

Cele pracy. Autorka sformułowała dwa główne cele pracy, którymi było określenie wpływu owocystatyny na komórki wybranych ludzkich linii nowotworowych jak: rak gruczołu piersiowego MCF-7 i MDA-MB-231, czerniak BM, rak płuc A549, rak wątrobowokomórkowy HepG2, fibroblasty skórne NHDF oraz ocena jej roli w indukcji procesu apoptozy w komórkach linii raka płuc (A549) oraz komórkach prawidłowych (NHDF).

Materiał i metody. Układ eksperymentu jest poprawny i nie budzi zastrzeżeń metodycznych. Doświadczenie zostało zaplanowane prawidłowo i w całości przeprowadzone w UM we Wrocławiu. Autorka przeprowadziła badania z użyciem referencyjnych, adherentnych ludzkich nowotworowych linii komórkowych, pochodzących z ATCC (*American type Culture Collection, USA*), natomiast BM i Hep G2 z *Banku Linii Komórkowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnych PAN we Wrocławiu*. Komórki prawidłowe pochodziły z firmy *Cambrex Bio Science*

(Walkersville, USA). Materiał ten gwarantuje wysoką wiarygodność badań i uzyskanie reprezentatywnych wyników. Autorka zastosowała odpowiednie płyny hodowlane oraz surowicę i antybiotyki w hodowlach 6 linii komórkowych. Podała też warunki przeprowadzenia hodowli oraz sposób pozyskania cystatyny z białka jaja kurzego (forma monometryczna i dimetryczna), opracowany na potrzeby projektu OVOCURA. W ocenie żywotności wybranych linii komórkowych zastosowała kolorymetryczny test MTT. Zakres jej stężeń wynosił od 0,15 – 19,2 μM , a całkowity czas inkubacji 48 i 72 h. Ponadto dla oceny procesu apoptozy zastosowała metodę kolorymetrycznej detekcji z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM), jak też drugą metodę - immunoblotingu (DotBlot). Metody te są poprawne i ogólnie przyjęte w tego typu badaniach biochemiczno-medycznych. Uzyskane wyniki poddała analizie statystycznej przy użyciu programu Prism 6.0, a rozkład zmiennych badała za pomocą testu Shapiro-Wilk'a. Dla porównania dwóch zmiennych niezależnych użyła testu Manna -Whitney'a (odpowiednik t-Studenta). Przyjęte przez Doktorantkę metody obliczeń statystycznych są wystarczające i prawidłowe metodycznie.

Wyniki badań. Uzyskane wyniki zostały szczegółowo opisane w tekście oraz graficznie przedstawione na 13 rycinach, 4 wykresach i 4 fotografiach. Na rycinach zaznaczone są istotności różnic między grupami przy $p < 0,05$. Wyniki zostały przedstawione dość szczegółowo, z wykazaniem oddziaływania monomeru i dimeru owocystatyny na badane komórki nowotworowe i prawidłowe. Generalnie rozdział ten jest dobrze napisany, poprawnie zinterpretowane wyniki, chociaż nieco mniej uwagi poświęciła Autorka wynikom badań przy użyciu techniki TEM.

Dyskusja. W rozdziale tym Doktorantka odniosła się do uzyskanych wyników badań eksperymentalnych, powołując się na liczne prace, głównie zagraniczne. Logicznie je interpretuje, chociaż w przypadku owocystatyny, jest zaledwie kilka prac, które można wykorzystać do interpretacji uzyskanych wyników badań własnych. Wykazała jednoznacznie efektywniejsze działanie monomeru (w porównaniu z dimerem). Generalnie w rozdziale tym jest zawartych wiele wartościowych informacji naukowych, potwierdzających możliwość wykorzystania tego białka w profilaktyce i terapii chorób nowotworowych. Nie wnoszę uwag merytorycznych.

Wnioski. W tym końcowym rozdziale Doktorantka zawarła uogólnienia i dość ostrożne stwierdzenia (w sumie jest ich 5). Autorka sugeruje, że przeprowadzone eksperymenty w modelu *in vitro* należałoby weryfikować na modelu *in vivo*, aby jednoznacznie potwierdzić przydatność owocystatyny w terapii przeciwnowotworowej, tym bardziej że nie oddziaływała ona negatywnie na prawidłowe komórki organizmu.

Streszczenie. Streszczenia w jęz. polskim i angielskim są syntezą przeprowadzonych eksperymentów, z krótkim podsumowaniem uzyskanych wyników, a szczególnie działania monomeru owocystatyny. Był on, jak wspomniano wcześniej, bardziej efektywny od dimeru tego polipeptydu.

Piśmiennictwo. Doktorantka przedstawiła w spisie 127 pozycji (krajowe i zagraniczne), z których znaczna część pochodzi z ostatnich 10 lat. Przy polskich czasopismach należy także stosować skróty bibliograficzne nazw czasopism, ponadto uważam, że zbędne jest podawanie numerów **doi** i daty **Epub**, w przypadku gdy praca posiada już numer tomu, rok i strony, a w pozycjach książkowych nie jest konieczne podawanie numeru ISBN. Zbędne jest podawanie przy numerach czasopism czasu ich wydania (miesiąc). Niejasno jest podana w spisie pozycja *Barrett - str. 82 oraz Krszyna i wsp. str. 88*.

Uwagi te nie mają większego znaczenia, a jedynie porządkujące (ujednolicenie), gdyż w przypadku złożenia pracy do druku różne są wymagania redakcyjne w tym zakresie.

Ogólnie dobór piśmiennictwa jest prawidłowy, poszczególne pozycje są wykorzystane w tekście pracy.

Podsumowanie

Podjęta przez Doktorantkę tematyka mieści się w ważnym nurcie nauk medycznych i biologicznych, jakim jest profilaktyka i terapia chorób nowotworowych. Przeprowadzone badania z zakresu wpływu owocystatyny na reakcje komórek nowotworowych z szerokim zakresem badań biochemicznych zasługują na szczególną uwagę, gdyż wciąż poszukuje się efektywnych metod w zapobieganiu i

leczeniu tej groźnej cywilizacyjnej choroby. Wyniki powinny być wykorzystane w dalszych badaniach (*in vivo*).

Wymienione z obowiązku recenzenta drobne uwagi powinny być uwzględnione przy przygotowywaniu pracy do publikacji. Nie umniejszają one merytorycznej wartości pracy, którą generalnie oceniam wysoko. Praca była trudna do realizacji z uwagi na szeroki zakres realizowanych badań laboratoryjnych. Doktorantka wykazała się dobrym teoretycznym i praktycznym przygotowaniem, dobrą organizacją warsztatu badawczego i samych eksperymentów oraz znajomością odpowiednich technik badawczych. Oceniana praca rozszerza interdyscyplinarne obszary wiedzy z zakresu medycyny i biotechnologii.

W zakończeniu stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w *Ustawie 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.). Wnoszę więc do **Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu** o dopuszczenie mgr inż. **Renaty Brykner-Ręczkowskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 05 września 2017 r.

Prof. dr hab. Zbigniew Dobrzański

