

Wzrost 19.02.2018

M. Ruciński
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
WYDZIAŁ LEKARSKI
Prodziekan ds. Nauki



prof. dr hab. Marzena Pucharska-Okciw
UNIwersytet Medyczny im. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD HISTOLOGII I EMBRIOLOGII

dr hab. Marcin Ruciński

Collegium Anatomicum, ul. H. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

tel.: +48 690 938 038, e-mail: marcinruc@ump.edu.pl

| | |
|---|--------------|
| Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu DZIEKANAT WYDZIAŁU LEKARSKIEGO | |
| wpl. dnia | 16 -02- 2018 |
| L.dz. DL/ Znak sprawy DL | 455/18 |

Poznań 04.02.18

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Łucji Cwynar-Zajac pt. „Działanie owocystatyny na przeszczepialne, mysie nowotwory gruczołu mlekowego”

Rak gruczołu piersiowego jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym wywodzącym się z tkanki nabłonkowej. Obecnie stanowi on główną przyczynę zgonów kobiet po 35. roku życia. Analizy epidemiologiczne wskazują wysoką zachorowalność oraz umieralność na nowotwory gruczołu piersiowego. Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy jest diagnoza w zaawansowanym stadium rozwoju choroby, dlatego też ciągle poszukuje się nowych czułych markerów wykrywania predyspozycji lub wczesnego stadium nowotworzenia. Pomimo kilku standardowych metod leczenia nowotworów gruczołu piersiowego, ich skuteczność jest stosunkowo niska. Z tego powodu uważam, że wszelkie badania mające na celu wskazanie nowych potencjalnych leków prowadzących do zmniejszenia ryzyka nawrotu choroby a przez co zwiększenia szansy przeżycia chorego, są niezwykle cenne i potrzebne. W tym kontekście rozprawa mgr Łucji Cwynar-Zajac wpisuje się w nurt aktualnych i niezwykle istotnych badań. W przedstawionej do recenzji pracy doktorantka podjęła się zbadania roli owocystatyny w procesie rozwoju choroby nowotworowej gruczołu piersiowego. W kompleksowym podejściu do tematu został także określony wpływ owocystatyny na modulację proliferacji, apoptozy oraz nekrozy guzów w eksperymentalnych modelach *in vivo* z wykorzystaniem modelu zwierzęcego. Ponadto zbadano ekspresję 84 genów istotnych dla procesu nowotworzenia gruczołu piersiowego.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma układ prawidłowy, typowy dla prac doktorskich, obejmuje łącznie 123 strony maszynopisu i składa się z wykazu stosowanych skrótów, wstępu, celu pracy, materiałów i metod, wyników, dyskusji, wniosków, streszczenia w języku polskim i angielskim, bibliografii, spisu tabel i rycin oraz aneksu zawierającego surowe dane uzyskane podczas przeprowadzania eksperymentów oraz odpowiednie skany zgód Lokalnej Komisji Bioetycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach. W pracy został umieszczony także wykaz dorobku naukowego doktorantki z którego wynika iż jest ona współautorką czterech publikacji listy filadelfijskiej o wysokiej wartości wskaźnika impact factor. Dodatkowo należy podkreślić iż prace te cieszą się zainteresowaniem innych badaczy i są często cytowane. Uważam, że jak na wczesny etap kariery naukowej jest to dorobek wyróżniający.

Wstęp pracy zaczyna się krótkim opisem wprowadzającym w istotę poruszanego tematu. Autorka opisuje czynniki ryzyka rozwoju raka gruczołu piersiowego podkreślając iż u około 50% kobiet chorych na raka piersi przyczyna zachorowania pozostaje nieznana. Przedstawia również dane epidemiologiczne z których wynika, że zachorowalność oraz umieralność na nowotwory piersi sukcesywnie rośnie. Dane te dotyczą okresu 1980-2013. Szkoda, że analizy te nie obejmują ostatnich lat, tym bardziej, iż według specjalistów, rzeczywiście zachorowalność rośnie, ale nie koreluje ona ze wzrostem umieralności. Liczba osób, których nie udaje się wyleczyć, jest od kilku lat stała i wynosi niecałe 6 tysięcy/rok.

W kolejnym rozdziale wstępu autorka omawia histologiczne typy raka gruczołu piersiowego, dzieląc je na raki nieinwazyjne oraz inwazyjne naciekające podścielisko. Następnie omawia aktualnie stosowane metody leczenia uwzględniając metody chirurgiczne, chemioterapię, hormonoterapie oraz radioterapię. Pokróćce zostały także opisane skutki uboczne wyżej stosowanych metod. Rozdział ten kończy konkluzją iż dla większości chorych w zaawansowanym stadium klinicznym, rak gruczołu piersiowego stanowi nieuleczalną chorobę i aby poprawić jakość życia chorych poszukuje się ciągle nowych leków, które będą bezpieczne, tanie i efektywne. Konkluzja ta stanowi właściwy wstęp do opisu cystatyn w tym owocystatyny będącej przedmiotem badań w proponowanej rozprawie. Na początku autorka wprowadza w temat opisując rodzinę białek cystatyn wraz z charakterystyką ich występowania. Następnie przechodzi do

owocystatyny szczegółowo opisując jej strukturę przestrzenną oraz parametry fizykochemiczne. Opisuje również najbardziej przebadaną ludzką cystatynę zwaną cystatyną C, wykazującą wysoki stopień homologii z owocystatyną, zarówno na poziomie samej sekwencji aminokwasowej jak i również struktury przestrzennej. Następnie dość szczegółowo opisuje rolę ludzkiej cystatyny C w procesach nowotworzenia oraz przerzutowania. Doktorantka słusznie zauważa, iż poziom cystatyny lub kompleksu katespyna B- cystatyna C negatywnie koreluje ze złośliwością oraz progresją wielu nowotworów. Odnosi się również do danych wskazujących, iż ekspresja cystatyny C ulega obniżeniu w rakach gruczołu piersiowego. Rozdział ten w ocenie recenzenta stanowi trafne uzasadnienie przyjętych hipotez badawczych oraz założeń stanowiących cele ocenianej rozprawy.

Głównym celem pracy była ocena wpływu owocystatyny na progresję nowotworzenia gruczołu piersiowego z zastosowaniem linii komórkowej gruczołu mlekowego 4T1 wszczepionej podskórnie w mysim modelu doświadczalnym. Główny cel badawczy został osiągnięty poprzez realizację następujących celów szczegółowych: 1) ocena stopnia martwicy guzów nowotworowych, 2) ocena apoptozy, 3) określenie ekspresji markera proliferacji Ki-67, 4) zbadanie ekspresji 84 genów, charakterystycznych dla nowotworów gruczołu piersiowego, zaangażowanych w takie szlaki jak: angiogeneza, adhezja, proteoliza, cykl komórkowy oraz apoptoza, 5) ocena masy ciała zwierząt, 6) ocena objętości i masy guzów nowotworowych. Cel główny jak i cele szczegółowe zostały jasno sprecyzowane oraz bezpośrednio wynikają z przedstawionego wcześniej wstępu pracy. Ponadto realizacja celów szczegółowych pozwoliła na uzyskanie odpowiedzi na pytanie stawiane w celu głównym, co wskazuje na pełne i szczegółowe podejście do poruszanego problemu badawczego.

Rozdział materiały i metody rozpoczyna się od krótkiej charakterystyki wykorzystywanych odczynników, linii komórkowych oraz zwierząt laboratoryjnych wraz podaniem informacji o producencie. Następnie Doktorantka opisuje metody badawcze które posłużyły do realizacji zakładanych celów. Koncepcja badań została przemyślana i nie budzi zastrzeżeń. W pierwszym etapie badań przeprowadzono testy toksykologiczne mające na celu ustalenie optymalnej dawki owocystatyny, wykorzystanej we właściwym eksperymencie. Na wyróżnienie zasługuje także sposób dozowania objętości

owocystatyny w odniesieniu do masy ciała zwierząt laboratoryjnych – według recenzenta takie podejście umożliwia uzyskanie jak największej homogenności badanych grup oraz porównywalną reakcję na badany związek. Rozdział został także wzbogacony o schematy doświadczalne, które ułatwiają zrozumienie koncepcji przeprowadzonych badań. Grupy badawcze zostały dobrane prawidłowo a ich liczebność jest wystarczająca do przeprowadzenia analiz statystycznych. Następnie doktorantka opisała metody morfometryczne, immunohistochemiczne wraz analizą ilościową. Podrozdziały te opisane są właściwie na wystarczającym poziomie szczegółowości i nie budzą zastrzeżeń. W kolejnym podrozdziale zostały opisane metody biologii molekularnej, gdzie szczegółowo przedstawiono procedury izolacji RNA, pomiaru współczynnika integralności RNA (RIN) oraz metodę RT-QPCR. Na podkreślenie zasługuje tutaj wykorzystanie elektroforezy kapilarnej do określenia jakości wyizolowanego RNA. Metoda ta stanowi alternatywę dla klasycznej elektroforezy kwasów nukleinowych, przy czym umożliwia uzyskanie dość precyzyjnych wykładników świadczących o integralności RNA zawartych w tzw. wartości RIN. Kolejnym podejściem badawczym wartym podkreślenia jest fakt wykorzystania macierzy PCR zawierających startery dla genów związanych z patogenezą raka gruczołu piersiowego. Autorka tą metodą przebadła ekspresję 84. genów co umożliwiło otrzymanie pełniejszego obrazu molekularnych zmian w badanym materiale. Z obowiązku recenzenta jestem zobligowany do zwrócenia uwagi na drobne niedociągnięcia omawianego rozdziału. Na stronie 37 błędnie podano dawkę ksylazyny: Przypuszczam, że prawidłowa dawka to 50-100 mg/kg m.c. Rycina 8 przedstawia zasadę elektroforezy kapilarnej wykorzystywanej do rozdzielania białek. Dla spójności z omawianą metodyką proponowałbym zamianę tej ryciny na taką, dotyczącą rozdzielania całkowitego RNA. Na stronie 44, z opisu dotyczącego mieszaniny reakcyjnej do trawienia genomowego DNA wynika, że końcowa objętość tej mieszaniny wynosi 14 μ l, natomiast w tabelce jest to 10 μ l. W podrozdziale Real-Time PCR brakuje informacji dotyczących liczebności grup. Czy materiał RNA był pulowany, czy też wykonywano reakcję dla wszystkich wyizolowanych RNA, łącznie z tymi z niską wartością RIN? Doktorantka pisze, że mieszaninę reakcyjną nakładano na płytkę 384 dołkową po 10 μ l na dołek, tymczasem z tabelki opisującej skład mieszaniny do przeprowadzenia reakcji PCR wynika, że podana objętość

mieszaniny wystarczyłoby na 130 dołków. Powyższe uwagi mają charakter czysto techniczny i w żaden sposób nie wpływają na wysoką ocenę omawianego rozdziału. Zaproponowane metody analiz statystycznych zostały dobrane prawidłowo i nie budzą zastrzeżeń.

Uzyskane wyniki przedstawiono łącznie na trzydziestu jeden stronach i zostały one dość obszernie udokumentowane oraz zaprezentowane w postaci: ośmiu tabel, ośmiu zdjęć mikroskopowych reakcji H+E oraz immunohistochemicznych, dwudziestu wykresów oraz pięciu zdjęć dotyczących doświadczeń na zwierzętach. Wspominane wyniki przedstawiono w sposób jasny i klarowny. Wartości istotne statystycznie zaznaczono poprzez symbol gwiazdki. Na wyróżnienie zasługują ładne zdjęcia mikroskopowe uzyskane z reakcji immunohistochemicznych, gdzie poza brązowym wybarwieniem produktów reakcji nie obserwuje się podbarwienia tła preparatu. Drobne uwagi dotyczące tej części rozprawy mają charakter głównie edytorsko-polemiczny. Dawki owocystatyny zamieszczone w opisie rycin różnią się od tych zawartych na samych wykresach. Ponadto trochę łagodniej interpretował bym wyniki zmian nieróżniących się statystycznie. W takich przypadkach nie stawiałbym zdań opisujących dany wynik jako pewniki ale raczej jako sugestie. Ponadto autorka piszę, że masa ciała myszy z guzami nowotworowymi otrzymującymi owocystatynę w dawce 10 mg/kg m.c. była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do masy ciała zwierząt z guzami, nieotrzymujących badanej substancji. Tu należałoby doprecyzować iż masa ciała rzeczywiście istotnie statystycznie wzrasta ale w pierwszych trzech cyklach podań owocystatyny a następnie się normalizuje. W kolejnej części wyników Doktorantka przedstawiła ocenę objętości oraz masy guzów nowotworowych, a następnie przeszła do oznaczeń markera proliferacji komórkowej - Ki-67 oraz apoptozy metodą TUNEL. Ważnym wynikiem jest wykazanie iż ekspresja Ki-67 zostaje obniżona po podaniu owocystatyny, natomiast stymulowany zostaje proces apoptozy. Jednocześnie zaobserwowano zwiększenie stopnia martwicy po podaniu owocystatyny. Wartość tych wyników jest na tyle wysoka, iż pozwala przypuszczać w jaki sposób owocystatyna może wywierać swój przeciwnowotworowy efekt. Na wykresie dotyczącym oceny jakości RNA widać, że niektóre próbki są silnie zdegradowane. Czy jest to materiał uzyskany od myszy, które nie przetrwały procedury doświadczałnej? Pytanie o tyle istotne, iż RNA bezpośrednio

po śmierci zwierzęcia ulega stopniowej degradacji, tak więc być może degradacja obserwowana na zdjęciu elektroforezy kapilarnej wynika właśnie z tego faktu. Wyniki reakcji real-time PCR zostały prawidłowo przedstawione oraz zinterpretowane. Zauważono, że głównie gen interleukiny 6 ulega podwyższonej ekspresji w obu dawkach po podaniu owocystatyny.

Uzyskane wyniki Autorka przedyskutowała w odniesieniu do dostępnych danych literaturowych, podkreślając ich oryginalność oraz nowatorstwo. Doktorantka odniosła się również do niespodziewanej nagłej śmierci zwierząt z guzami nowotworowymi otrzymującymi badany związek. Z dużym prawdopodobieństwem trafnie zinterpretowała zaistniałą niespodziewaną sytuację jako zespół rozpadu guza, wyjaśniając na czym polega to zjawisko. Onkostatyczne działanie owocystatyny zostało także przedyskutowane w odniesieniu do inhibitorów katepsyny B - również zwracając uwagę na różnice w odniesieniu do własnych wyników. Reasumując uważam, że dyskusja jest trafna, rzetelna i obejmuje wszystkie aspekty uzyskanych wyników. Rozdział ten jest wartościowy merytorycznie i świadczy o głębokiej znajomości badanej problematyki, a także dojrzałości Autorki dysertacji w formułowaniu i analizowaniu zagadnień badawczych. Wnioski są zdefiniowane prawidłowo, jasno wynikają ze stawianych celów rozprawy i znajdują potwierdzenie w przedstawionych wynikach pracy.

Pomimo kilku, krytyczno-polemicznych uwag moja opinia o przedstawionej rozprawie jest bardzo dobra. Doktorantka zrealizowała wszystkie postawione przed sobą cele badawcze. Zaprezentowane badania są oryginalne i stanowią istotny wkład w nowoczesną metodologię badań nad poszukiwaniem nowych związków wspomagających w leczeniu raka gruczołu piersiowego. Praca napisana jest starannie, w dobrym stylu z nielicznymi błędami językowo—redakcyjnymi.

Podsumowując, przedstawiona do oceny dysertacja spełnia ustawowe wymogi 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.). Doktorantka wykazała się dużą erudycją i umiejętnością przygotowania pracy naukowej oraz posiada bogaty warsztat badawczy oparty na nowoczesnej metodologii biologii molekularnej, eksperymentalnej oraz histologii. Uważam, że Doktorantka osiągnęła stopień dojrzałości naukowej uprawniającej ją o ubieganie się o stopień

doktora i w związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr. Łucji Cwynar-Zajac do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze wysoką wartość merytoryczną ocenianej rozprawy wnioskuję również o jej wyróżnienie.

dr hab. Marcin Ruciński

Reuben Mann

