

Prof. dr hab. Tadeusz Trziszka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja

Pracy doktorskiej pt.: „Działanie owocystatyny na przeszczepialne, mysie nowotwory gruczołu mlekowego”

Autor: mgr Łucja Cwynar-Zajac

Promotor: Prof. dr hab. Piotr Dziegiel

Pracę wykonano na Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Lekarski

1. Wartość podjętej tematyki w świetle aktualnych trendów

Autorka pracy doktorskiej na samym jej wstępie zaznacza, że wyniki jej badań są częścią projektu finansowanego z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka w latach 2007 – 2013 – 2018; pt.: „Innowacyjne technologie produkcji biopreparatów na bazie nowej generacji jaj (OVOCURA)”. Przedmiotowy projekt był połączonym sukcesem współpracy Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu i Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Wśród wielu obszarów badawczych w projekcie jednym z najważniejszych był obszar badań nad owocystatyną, izolowaną z białka jaj jako potencjalny preparat w terapii chorób nowotworowych.

W ostatnich dekadach choroby nowotworowe stanowią istotne zagrożenie społeczeństw na całym świecie. Po II wojnie światowej w wielu krajach świata nastąpiła transformacja zdrowotna.

Choroby zakaźne przestały być najważniejszą grupą przyczyn zgonu. Upowszechnienie szczepień ochronnych oraz rozwój medycyny doprowadziły do spadku umieralności niemowląt, a wzrost jakości życia prowadzi do opóźnienia śmiertelności ludzi. Jednakże zmieniający się styl życia, tj.: zmiany w diecie prowadzące do otyłości, wzrost spożycia tytoniu i alkoholu, stres doprowadziły w konsekwencji do wzrostu występowania chorób cywilizacyjnych, w tym głównie układu krążenia, cukrzyca, nadciśnienia oraz chorób nowotworowych.

Choroby nowotworowe stanowią istotny problem społeczny. Dotykają bowiem nie tylko samych pacjentów, ale również ich bliskich. Udostępnienie nowoczesnych i coraz skuteczniejszych terapii przeciwnowotworowych ma zatem znaczenie dla istotnej liczebnie populacji. Biorąc pod uwagę prognozy rosnącej zachorowalności, kwestia ta będzie nabierać z czasem coraz większej wagi. Niezbędne staje się więc podjęcie działań poprawiających dostępność nowoczesnych metod leczenia onkologicznego w Polsce.

Nowotwory to również ważny problem w ujęciu ekonomicznym. W tym wymiarze ocena obciążenia skutkami choroby zazwyczaj skupiona jest na kosztach bezpośrednich związanych z leczeniem i wykorzystaniem zasobów systemu ochrony zdrowia. Natomiast często pomijane są koszty związane z utratą produkcji w gospodarce na skutek występowania chorób - tzw. koszty pośrednie. Dlatego konieczne jest jak najszybsze podjęcie działań usprawniających zarówno obszary profilaktyki zachorowań na nowotwory, jak i poprawy efektywności leczenia.

Straty, jakie w 2013 roku poniosła polska gospodarka na skutek nowotworów złośliwych sięgnęły niemal 17 miliardów złotych. Tyle bowiem wyniosły koszty pośrednie związane z przedwczesnymi zgonami, niezdolnością do wykonywania pracy oraz zatrudnianiem opiekunów. Szacunki wskazują, że w ciągu nadchodzących 10 - 15 lat koszty te będą znacznie wyższe. Aby je

zminimalizować, konieczna jest poprawa jakości zarządzania leczeniem onkologicznym oraz zapewnienie dostępu do innowacyjnych terapii.

Nowotwory to bez wątpienia jedna z największych bolączek obecnych czasów. W 2012 roku stanowiły one przyczynę śmierci niemal 99 tys. Polaków, odpowiadając za ponad 1/4 wszystkich zgonów. W Polsce, podobnie jak ma to miejsce w krajach Unii Europejskiej są one dziś drugą, po chorobach układu krążenia, przyczyną zgonów. Prognozy wskazują, że w ciągu dziesięciu lat choroby nowotworowe staną się najbardziej powszechną przyczyną śmierci w naszym kraju. Wydatki na opiekę onkologiczną w Polsce kształtują się na niskim poziomie w porównaniu do Europy i świata. Po uwzględnieniu występujących różnic w sile nabywczej, na opiekę onkologiczną w Polsce w 2013 r. wydatkowano zaledwie 70 euro na mieszkańca. Dla porównania, wydatki na opiekę onkologiczną w Czechach kształtowały się na poziomie 124 euro na osobę, w Wielkiej Brytanii – 154 euro, a w USA – 323 euro.

Odnosząc się do przedmiotu badań i treści pracy doktorskiej należy podkreślić, że rak gruczołu piersiowego jest najczęściej diagnozowanym nowotworem na świecie, a także główną przyczyną śmierci wśród kobiet. Dlatego badania w tym zakresie są tak ważne nie tylko z medycznego, ale także z społecznego i gospodarczego punktu widzenia. W tym zakresie koniecznym jest poszukiwanie nowych metod leczenia i innowacyjnych preparatów o wysokiej skuteczności i bez negatywnych efektów ubocznych. Zespół profesora Piotra Dzięgiela w szeroko zakrojonych badaniach wykazał, że owocystatyna naturalnego pochodzenia może być interesującym czynnikiem w terapii nowotworu gruczołu mlekowego. Badania ujęte w przedmiotowej pracy doktorskiej na modelu mysim są tego potwierdzeniem.

2. Charakterystyka pracy, założenia i realizacja badań

Przedmiotem badań ujętych w tytule i celu pracy był wpływ działania owocystatyny na przeszczepialne, mysie nowotwory gruczołu mlekowego.

Treść przedkładanej pracy została przedstawiona na 120 stronach, w tym w 8 rozdziałach ściśle związanych z treścią pracy, a ponadto zostały dołączone załączniki, wykaz skrótów, tabel i rycin oraz streszczenia w języku polskim i angielskim, a także własny dorobek naukowy. W zestawieniu bibliograficznym autorka wykorzystowała 121 pozycji literaturowych.

W rozdziale – Wstęp (2) - Autorka przedstawiła informacje literaturowe dot. problemu społecznego jaki powoduje nowotwór gruczołu piersiowego, a także epidemiologię i czynniki ryzyka z tym związane

W rozdziale - Cel pracy (3) przedstawiono jego uzasadnienie uwzględniając mysi model doświadczalny. Jednocześnie sformułowano sześć celów cząstkowych, tworząc wysoce precyzyjny układ badawczy.

W rozdziale - Materiały (4) opisano: a) monomer cystatyny z białka jaja (owocystatyna), b) Linie komórkową 4T1 raka gruczołu mlekowego, c) Pożywki hodowlane i płyny, odczynniki i przeciwciała, d) zwierzęta doświadczalne.

W rozdziale – Metody (5) przedstawiono proces hodowli mysich komórek oraz badania na zwierzętach doświadczalnych z uwzględnieniem zatwierdzenia tych badań przez Komisję Etyczną. Ponadto przedstawiono testy toksykologiczne w oparciu o schemat pobierania materiału. Opisano proces przeszczepiania komórek nowotworowych myszom. Precyzyjnie zaprezentowano model podawania myszom owocystatyny.

Szczegółowo opisano metody pomiarowe efektów w czasie rozwoju nowotworu, w tym pomiar objętości i masy guzów, metody immunohistochemiczne, wykrywanie apoptozy metodą TUNEL, metody biologii molekularnej oraz metody statystyczne.

W rozdziale - Wyniki (6) przedstawiono pełną dokumentację wyników (tabele, ryciny) prowadzonych eksperymentów ujętych we wszystkie elementy stanowiące założenia badawcze, tj.: a) ocena pomiaru masy ciała myszy, b) ocena histopatologiczna narządów, c) ocena enzymów wątrobowych myszy, d) efekty podawania owocystatyny na testy toksykologiczne.

W rozdziale - Dyskusja (7) zaprezentowano i omówiono wyniki badań w odniesieniu do dostępnej literatury.

W rozdziale – Wnioski (8) przedstawiono łącznie cztery syntetyczne wnioski.

Rozdział - Piśmiennictwo (11) przedstawia zestawienie literaturowe. Należy podkreślić, że Autorka zaprezentowała dorobek wiedzy z ostatniego ćwierćwiecza dot. obszaru jej pracy doktorskiej. Na pozostałych stronach zestawiono załączniki stanowiące dokumentację pracy. Dokumentację stanowiło 15 tabel i 41 rycin, formularze badań i inne dokumenty medyczne.

3. Ocena merytoryczna pracy

Podjęta tematyka badawcza stanowi interesujący, a także ważny obszar eksperymentalny, o dużym ciężarze gatunkowym i istotnym znaczeniu, zwłaszcza w odniesieniu do zdrowia publicznego. Badania mają charakter nowatorski w uwzględnieniu zastosowania owocystatyny w terapii nowotworów gruczołu piersiowego.

Tytuł pracy jest adekwatny do treści, a kolejność rozdziałów odpowiada wymogom pracy doktorskiej.

Jako pierwszy rozdział Autorka wstawiła wykaz skrótów (str. 8 – 10), co jest niezbędne i ułatwia czytelnikowi zrozumienie treści pracy.

Rozdział 2 – Wstęp (str. 11-26); dotyczy przeglądu literatury, gdzie bardzo interesująco i treściwie przedstawiono zagadnienie dotyczące problemu jaki stanowią nowotwory gruczołu piersiowego oraz obserwowaną w ostatnich latach rosnącą zachorowalność. Autorka prezentując epidemiologię i czynniki ryzyka nowotworu piersi proponuje zastosowanie w terapii tego nowotworu cystatynę jaja kurzego. Dlatego też dość szczegółowo opisuje tę specyficzną substancję. Ponadto Autorka opisała metody leczenia nowotworów gruczołu mlekowego. Bardzo szeroko przedstawiła działanie inhibitorów proteaz cysteinowych, a szczególności cystatyny białka jaja kurzego (owocystatyna). Materiał ten jest bardzo dobrym studium literaturowym, wskazując na rosnące zainteresowanie cystatyną jako wysoce aktywną biosubstancją o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym wobec nowotworów.

Jednak wg recenzenta, szkoda, że Autorka nie przedstawiła badań zespołu Profesora Piotra Dzięgiela, który intensywnie i z dużym sukcesem pracował nad terapeutyczną rolą cystatyny w uwzględnieniu różnych linii komórkowych. Można rozumieć, że jest to skromność promotora, ale tego typu fakty należałoby wyeksponować.

Rozdział 3 – Cel pracy (str. 27 – 28).

Generalnie zdaniem recenzenta cel pracy został zaprezentowany zbyt mocno w sposób opisowy powtarzając informacje z „Wstępu”. Najbardziej syntetyczny opis celu jest zawarty na str. 27 w akapicie od wiersza 14 do 27 licząc od góry. W tym fragmencie cel pracy jest precyzyjnie przedstawiony.

Rozdział 4 – Materiały (str. 29 – 31) – został precyzyjnie i krótko opisany, nie budząc jakichkolwiek zastrzeżeń.

Rozdział 5 – Metody (str. 32 – 48) zostały precyzyjnie dobrane i opisane. Bardzo ważnym był test toksykologiczny w celu wytypowania odpowiedniej i skutecznej dawki owocystatyny (OC).

Przyjęto trzy dawki preparatu; 1, 10, 20 mg/kg masy ciała. W eksperymencie celowym uwzględniono sześć grup badawczych, w tym myszy z guzem i bez guza oraz z dawką cystatyny 0, 5 i 10 mg/kg m.c. Taki układ doświadczenia należy uznać za wzorcowy. Również przyjęte metody badań, zwłaszcza histochemiczne i biologii molekularnej pozwalają na dokładną analizę oraz wyciągnięcie prawidłowych wniosków.

Rozdział 6 – Wyniki (str. 49 – 79) zostały precyzyjnie przedstawione z bogatą dokumentacją.

Wyniki badań obejmowały testy toksykologiczne z udziałem preparatu cystatyny, w tym szeroko analizowano zmiany masy ciała, dokonano oceny histopatologicznej narządów oraz enzymów wątrobowych. W dalszej części prezentacji wyników ujęto testy właściwe, gdzie oceniano masę ciała, oceniano guzy (objętość, masa), opisano badania immunohistochemiczne oraz dokonano oceny martwicy guza.

Rozdział 7 – Dyskusja (str. 80 – 88). Autorka przeprowadziła szeroką i rzeczową dyskusję własnych wyników badań w odniesieniu do badań innych autorów. Treść dyskusji wskazuje na dojrzałość naukową oraz wysoką zdolność oceny zjawisk. Przykładowo wysoki poziom interleukiny 6 (IL 6) przy terapii owocystatyną Autorka odnosi do zespołu rozpadu nowotworu (TLS). Tym samym Autorka potwierdza terapeutyczne właściwości owocystatyny wskazując na to zjawisko jako efekt obniżenia ekspresji antygenu proliferacyjnego Ki-67. Konieczne są dalsze badania, szczególnie w zakresie formulacji tego preparatu i zastosowania odpowiedniego nośnika. Zdaniem recenzenta jest to dobrze opracowany rozdział pod względem merytorycznym i praktycznym.

Uwagę recenzenta zwróciły cytowane badania zespołu Malickiej-Błaszkiwicz (2014), których brak jest w zestawieniu literaturowym.

Rozdział 8 – Wnioski (str. 89). Autorka na podstawie przeprowadzonej wnikliwie dyskusji wyciągnęła cztery bardzo trafne i skondensowane wnioski, wskazując jednocześnie na wysoką przydatność owocystatyny w wspomaganiu leczenia nowotworów gruczołu mlekowego.

Streszczenia (Rozdział 9 i 10) zostały zaprezentowane w bardzo dobry sposób oddając cały zakres przeprowadzonych badań.

Zaprezentowane zestawienie literaturowe (Rozdział 11 – Piśmiennictwo) i jego wykorzystanie w treści pracy zasługuje na uznanie, tym bardziej, że jest to przekrój najbardziej adekwatnej wiedzy w tym zakresie.

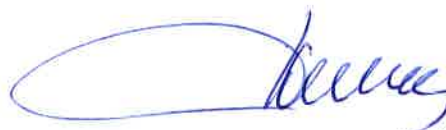
Niewątpliwie duże doświadczenia naukowo-badawcze Pana Promotora pozwoliły na wysoką jakość przedłożonej do recenzji pracy.

4. Uwagi końcowe

Recenzja pracy doktorskiej „*Działanie owocystatyny na przeszczepialne, mysie nowotwory gruczołu mlekowego*” Pani mgr Łucji Cwynar-Zajac i przedstawiona ocena merytoryczna ujęta w punkcie 3, w tym uwagi krytyczne nie umniejszają jej wartości zarówno poznawczej jak i praktycznej.

Uwzględniając całokształt, tj. wybór tematu, szeroką wiedzę Doktorantki, w tym znajomość najnowszej literatury, dobór materiału i biegłość analityczna, a także precyzyjnie przygotowana dokumentacja wyników oraz możliwości ich wykorzystania w publikacjach i innych opracowaniach metodycznych upoważniają recenzenta do stwierdzenia oryginalności pracy i jej wysokiej wartości naukowej i praktycznej.

Jednocześnie stwierdzam, że praca spełnia kryteria dla dysertacji doktorskich określonych w dokumentach prawnych o stopniach naukowych i tytule naukowym . W związku z powyższym uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Łucji Cwynar-Zajac do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na nowatorskie badania i ich precyzyjne wykonanie proponuję wyróżnienie pracy, o ile to możliwe nagrodą.



Wrocław, 24.04.2018 r.

prof. dr hab. inż. Tadeusz Trziszka