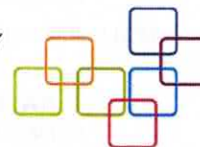


Bydgoszcz, dnia r.

**Ocena rozprawy doktorskiej Pana mgr Mirona Tokarskiego
pt. „Identyfikacja cząsteczek regulujących szlak sygnałowy HGF - c-Met w
komórkach śródbłonna stymulowanych hipoksją”**

Mechanizmy angiogenezy pełnią niezwykle istotną rolę w życiu organizmów posiadających układ krwionośny, do których zaliczają się również ludzie. Od prawidłowego ich przebiegu, zarówno w życiu pre- jak i postnatalnym zależą istotne procesy utrzymujące homeostazę organizmu, takie jak transport tlenu czy substancji odżywczych oraz usuwanie produktów przemiany materii. Komórki śródbłonna pełnią szczególnie istotną rolę w regulowaniu procesów fizjologicznych zachodzących w naczyniach krwionośnych, jednak ich udział w tworzeniu nowych naczyń, szczególnie w okresie postnatalnym, nadal nie został poznany w zadowalającym stopniu. W tym kontekście rozprawa doktorska mgr Mirona Tokarskiego bardzo dobrze odpowiada na aktualne potrzeby badawcze, podejmuje bowiem zagadnienia związane angiogenezą, a w szczególności z podstawami jej indukcji i regulacji na poziomie molekularnym, z uwzględnieniem licznych czynników regulujących ten proces w żywym organizmie. Jednym z takich czynników jest stan hipoksji, występujący w tkankach oddalonych od naczyń krwionośnych i stymulujący powstawanie takich naczyń.

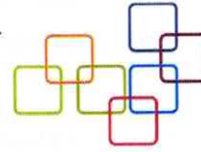
Autor recenzowanej rozprawy postawił sobie za główny cel określenie wpływu hipoksji na regulację szlaku sygnałowego HGFA – HGF – c-Met w dojrzałych i progenitorowych komórkach śródbłonna. Aby zrealizować ten cel wybrał dwie linie komórkowe reprezentujące komórki progenitorowe oraz jedną linię reprezentującą dojrzały śródbłonek. Poddanie badaniom komórki wprowadził w stan hipoksji indukowanej chemicznie a następnie przeprowadził na nich szereg starannie zaplanowanych eksperymentów, mających na celu określenie poziomu ekspresji wybranych genów w oparciu o ilość RNA i białek reprezentujących poszczególne



geny. W kolejnym etapie eksperymentu Autor przeprowadził analizę poziomu ekspresji kilkuset cząsteczek mikroRNA w celu wytypowania tych, których obecność w badanych komórkach jest związana ze zróżnicowaną ekspresją genów analizowanego szlaku sygnałowego.

Rozprawa mgr Mirona Tokarskiego posiada układ charakterystyczny dla opracowań o charakterze eksperymentalnym. Składa się ze streszczenia, obszernego i dobrze wprowadzającego w tematykę pracy wstępu, jasno i zwięźle określonych celów, charakterystyki badanego materiału biologicznego oraz opisu metod molekularnych i statystycznych, przejrzystości przedstawionych wyników badań oraz dojrzałej w swoich sformułowaniach dyskusji. Do pracy nie dołączono jednak wykazu stosowanych skrótów i symboli, który mógłby stanowić znaczącą pomoc dla czytelnika nie mającego na co dzień do czynienia z procesami biologicznymi i metodyką opisywanymi w ocenianej dysertacji. Na podstawie wyników badań Doktorant sformułował dziewięć uprawnionych wniosków końcowych. Praca zawiera spis piśmiennictwa obejmujący 244 dobrze dobranych pozycji, a także spisy ilustracji i tabel.

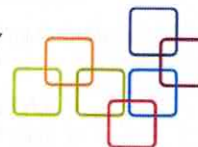
Wstęp do rozprawy mgr Mirona Tokarskiego zawiera obszerne wprowadzenie do tematyki jego badań i jest zredagowany w moim przekonaniu w sposób modelowy, zarówno co do zawartości, jak i objętości. Po krótkim opisanu zagadnień związanych z biologicznymi aspektami angiogenezy i jej znaczenia w ontogenezie oraz w zdrowych i zmienionych chorobowo tkankach, Autor przechodzi do scharakteryzowania poznanych już mechanizmów molekularnych rządzących procesem powstawania nowych naczyń krwionośnych. Dzięki temu we wstępie zawarte są wszystkie niezbędne informacje prowadzące logicznie do celu pracy, a jednocześnie niemalże wszystkie wątki z tej części rozprawy znajdują swoje późniejsze odzwierciedlenie i kontynuację w dyskusji. Jedyna moja uwaga do tej części pracy ma charakter językowy i dotyczy używania przez Autora zarówno we wstępie jak i w dalszej części publikacji wyrażenia „ekspresjonowany” w odniesieniu do genu ulegającego w danej tkance ekspresji. O ile mi wiadomo, słowo



„ekspresjonowany” nie występuje w żadnym słowniku języka polskiego (w odróżnieniu od wyrażenia „ekspresja genu” w znaczeniu: „odczytanie informacji genetycznej i przepisanie jej na białka”, które można znaleźć np. w internetowym słowniku sjp.pl). Nie widzę również istotnego powodu, dla którego należałoby wprowadzać tę oczywistą kalkę z języka angielskiego w miejsce powszechnie przyjętego w języku polskim i stosowanego od lat sformułowania „gen ulegający ekspresji”. Ponadto warto byłoby, aby Autor rozważył, czy zamiast niegramatycznych sformułowań w rodzaju „Struktura białka HGF została przedstawiona na Rycinie 6” (str. 21) nie lepiej byłoby z szacunku do języka ojczystego stosować odpowiednią deklinację rzeczowników („... przedstawiona na Rycinie 6”). Powyższe uwagi mają jednak raczej charakter korektorski i w żaden sposób nie ujmują kompletności i przejrzystości omawianego rozdziału pracy.

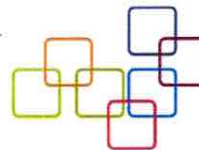
Realizując cel swojej rozprawy mgr Miron Tokarski precyzyjnie opisał linie komórkowe wykorzystane w prowadzonych eksperymentach a także szczegółowo i właściwie przedstawił stosowane metody laboratoryjne i powody, dla których te właśnie metody wybrał. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Autor zdecydował się na wykorzystanie w swoich eksperymentach rozbudowanego warsztatu badawczego, obejmującego zróżnicowane metody analizy ekspresji genów, począwszy o standardowej techniki Western blotu a skończywszy na multipleksowej analizie poziomu ekspresji setek różnych cząsteczek mikroRNA przy pomocy reakcji RT-PCR. Na uwagę zasługują również zaawansowane metody analizy statystycznej i bioinformatycznej uzyskanych danych, wykorzystane dla potrzeb recenzowanej pracy.

Jak wynika z lektury rozdziału „Wyniki”, Doktorant prawidłowo zrealizował cel główny, jak i wszystkie cele cząstkowe. Wyniki poszczególnych analiz zostały zasadniczo przedstawione w sposób przejrzysty i zrozumiały, zarówno w warstwie opisowej, jak i graficznej. Problematyczne w tym aspekcie okazało się jednak kilka tabel (22, 25, 29 i 33), w których nagromadzenie informacji jest tak duże, że traci na tym ich czytelność. Z recenzenckiego obowiązku wypada również wspomnieć o drobnych błędach edycyjnych i stylistycznych obecnych w omawianym rozdziale,



takich jak przeniesienie ostatniego rzędu Tabeli 13 na kolejną stronę czy też powtórzenie wyrazu „oraz” w zdaniu rozpoczynającym wers na stronie 59. Poza drobnymi uchybieniami edytorskimi tę część pracy oceniam bardzo wysoko. W szczególności pragnę docenić fakt, iż Autor zdecydował się podzielić wynikami eksperymentów przeprowadzonych metodą Western blot, które nie pozwoliły na uzyskanie informatywnych danych o ekspresji badanych białek. Decyzja o udostępnieniu tych danych, które być może niektórzy potraktowaliby jako porażkę eksperymentu, świadczy w istocie o naukowej dojrzałości Doktoranta, który rozumie wagę dzielenia się ze społecznością naukową wynikami wszelkich prowadzonych eksperymentów. Każdy bowiem wynik, nawet negatywny, niesie ze sobą informację, która może okazać się w przyszłości użyteczna dla kolejnych eksperymentatorów.

W „Dyskusji” Doktorant w sposób bardzo dojrzały, wyczerpujący i krytyczny przedyskutował wszystkie wyniki badań własnych na tle ustaleń poczynionych przez innych autorów. W szczególności widoczny jest fakt nowatorskiego podejścia Autora do zagadnienia neowaskularyzacji, polegający na wykorzystaniu hodowli komórkowych lepiej naśladujących fizjologiczne funkcje śródbłonna niż wykorzystywane dotychczas przez większość innych autorów modele oparte na liniach komórkowych pochodzenia nowotworowego. Na uwagę zasługuje również szczegółowe omówienie wykrytych w ramach eksperymentów prowadzonych przez Doktoranta korelacji pomiędzy ekspresją genów badanego szlaku sygnałowego a poziomem określonych, wskazanych eksperymentalnie cząsteczek mikroRNA. Autor nie poprzestaje na suchym wyliczeniu zaobserwowanych korelacji, ale stara się je wyjaśnić na poziomie funkcjonalnym, posługując się własnymi danymi eksperymentalnymi i konfrontując te wyniki z danymi z publikacji innych badaczy. Warto też wspomnieć o krytycznym podejściu Autora do własnego modelu badawczego, znajdującym odzwierciedlenie w rozważaniach odnośnie różnic pomiędzy hipoksją indukowaną chemicznie a hipoksją występującą naturalnie w tkankach żywego organizmu. Świadomość ograniczeń stosowanego modelu badawczego to sygnatura dojrzałego naukowca.



Z technicznego punktu widzenia pewnym niedociągnięciem dyskusji jest miejscami zbyt rzadkie odwoływanie się do danych literaturowych. Przykładowo w pierwszym akapicie na stronie 125, poczynając od trzeciej jego linii do samego jego końca nie ma żadnego odniesienia do literatury pomimo powoływania się na wyniki badań innych naukowców.

Rozprawa mgr Mirona Tokarskiego jest napisana poprawną polszczyzną, a jej edycja jest staranna. Moją uwagę przykuła jedynie pewna powtarzająca się niezręczność językowa, polegająca na przypisywaniu skrótowcom określającym kwasy nukleinowe rodzaju nijakiego („to RNA”), podczas gdy substancje, które te skrótowce określają mają przypisany rodzaj męski („ten kwas rybonukleinowy”). Logiczne zatem wydaje się, że również skrótowiec powinien występować w formie męskiej („ten RNA”). Niezręczność ta, podobnie jak i wspomniane wcześniej drobne błędy edycyjne oraz nieliczne błędy literowe i interpunkcyjne mogą być łatwo skorygowane i nie rzutują znacząco na pozytywny odbiór całości recenzowanej dysertacji.

Podsumowując, wyniki badań uzyskane w ramach realizacji rozprawy doktorskiej mgr Mirona Tokarskiego cechuje w mojej opinii wysoka wartość naukowa. Oceniana praca, będąca bez wątpienia oryginalnym rozwiązaniem problemu badawczego, została wykonana poprawnie, na odpowiednim materiale badanym i z wykorzystaniem właściwych metod molekularnych oraz technik statystycznych, a jej redakcja jest przejrzysta i zrozumiała.

Dlatego też bardzo proszę Wysoką Radę Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Mirona Tokarskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Marcin Woźniak, prof. UMK

