dr hab. inż. Mariusz Korczyński, prof. nadzw. UPWr
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt
Katedra Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa

RECENZJA

pracy doktorskiej lek. wet. **Małgorzaty Tarnowskiej**

pt. **„Ocena właściwości związków biologicznie czynnych zawartych w jadach węży *Bitis arietans* i *Bitis nasicornis*"**

promotor: dr hab. Dorota Diakowska, prof. nadzw.

(Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,

Wydział Nauk o Zdrowiu)

Podstawa formalna:

- ***Pismo Pani prof. dr hab. Izabelli Uchmanowicz, Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki o Zdrowiu, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu z dnia 7 marca 2022 r. (nr pisma RN-BZ.4000.189.2019)***

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera ogółem 134 ponumerowane strony. Poszczególne rozdziały to:" Wykaz stosowanych skrótów" s.6; *„Wstęp" s. 7-30, „Cel pracy"* s. 31, *„Materiał i metody"* s. 32 - 41, z podziałem na podrozdziały dotyczące: materiału badawczego, użytych w doświadczeniu substancji chemicznych, analiz i oznaczeń w materiale biologicznym oraz metod i analiz

statystycznych, jakim poddano uzyskane w doświadczeniu wyniki. Kolejny rozdział główny - „*Wyniki*" - zawiera bardzo syntetyczny opis uzyskanych rezultatów doświadczenia, podzielony jest na podrozdziały dotyczące kolejno: oznaczenia aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej jadów węży; pomiaru poziomu białka w jadach oraz określenia ich mas molekularnych dla poszczególnych frakcji; oceny aktywności cytotoksycznej jadów względem linii komórkowych A375 i MeWo w układach czasowych oraz ocenę mikroskopową zmian morfologicznych komórek poddanych działaniu badanych jadów. Dalsze części dysertacji to: „*Dyskusja*" s. 90 – 106, „*Wnioski*" s. 107, „*Streszczenia*" s. 108 – 111 oraz spis tabel, wykresów i zdjęć. W *Bibliografii* wykazanych jest 188 pozycji literatury. Praca zawiera 29 tabel oraz 38 rycin. Ma postać zwartego maszynopisu i została opracowana w języku polskim. Przedstawione w dysertacji rozdziały tworzą logiczną całość. Oceniana praca zawiera podstawowe 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.).

Ocena merytoryczna

A. **Wstęp i źródła literatury**

W rozdziale „Wstęp" Doktorantka w sposób syntetyczny przedstawiła właściwości substancji naturalnych występujących w jadach węży, ich chemiczną charakterystykę i bioaktywność oraz potencjalne zastosowanie w medycynie ludzkiej, wprowadzając sprawnie czytelnika w konkretne kierunki ich wykorzystania. Bezsprzecznie wskazała na możliwości ich wykorzystania w walce z lekoopornością bakterii czy też nowotworami.

W kolejnym podrozdziale Autorka w sposób kompleksowy opisała dotychczasowe wyniki badań nad potencjałem farmakologicznym substancji izolowanych z jadów węży – kolejno - jako leki wpływające na procesy krzepnięcia krwi, substancje przeciwnowotworowe, wykorzystywane w algezjologii, oddziałujące

na układ nerwowy czy też jako substancje o właściwościach bakterio- i grzybobójczych. W tej części dysertacji przytoczone są liczne wyniki badań naukowych na ten temat wraz z dokładnym opisem farmakokinetyki dla poszczególnych substancji czynnych zawartych w jadach różnych gatunków węży.

Doktorantka w kolejnych dwóch podrozdziałach przedstawiła krótką charakterystykę morfologii, biologii dwóch gatunków węży (żmija sykliwa, żmija rogatonosa), których jady są przedmiotem przedstawionych do oceny badań. W ostatnich dwóch podrozdziałach znajdujemy uzasadnienie wyboru szczepów mikroorganizmów oraz linii komórek nowotworowych skóry, które były przedmiotem badania skuteczności testowanych jadów.

Rozdział „Wstęp" jest obszerny i wielowątkowo wprowadza w tematykę, jakiej podjęła się Autorka w swoich badaniach. **Posiada on jedną wadę techniczną. Autorka używa tylko nazw łacińskich (za wyjątkiem stron 18, 19 oraz podrozdziałów 2.2.1 i 2.2.2) poszczególnych gatunków węży, od których kolejni, cytowani badacze pozyskiwali jad do swoich badań. Zabieg taki spowodował, że czytającemu zajmuje sporo czasu, aby zidentyfikować te gatunki. Pragnę również podkreślić, że publikacje, jakie powstaną z tego materiału, będą czytać chemicy, medycy czy farmaceuci a nie tylko ofiolodzy. Przy przygotowywaniu manuskryptów zalecam używania obok nazw łacińskich również nazewnictwa w języku docelowym.**

B. Część doświadczalna

Cel badań

Jak wskazała Autorka „celem badań było" zamiast „celem pracy było". Poza tym błędem nomenklaturowym jasno wskazano hipotezę badawczą. Cele szczegółowe są nazwane prawidłowo i wskazują na określenie właściwości przeciwdrobnoustrojowych jadów żmii sykliwej i żmii rogatonosej, wstępną charakterystykę białek zawartych w obu jadach oraz ich cytotoksyczność względem komórek nowotworów skóry.

Materiał i metody

Zaplanowane analizy laboratoryjne jadów należy jednoznacznie zaliczyć do badań podstawowych i wstępnych (białko i rozdział wraz z określeniem mas molekularnych grup białek).

Głównym trzonem tego rozdziału jest metodologia oceny cytotoksyczności jadów względem dwóch linii komórek nowotworów skóry (A375 oraz MeWo) z wykorzystaniem testu MTT oraz SRB (wyznaczając IC_{50}) a także oszacowanie poziomu hamowania wzrostu wybranych bakterii patogennych oraz jednego gatunku grzyba wraz z określeniem poziomu MIC.

Testy laboratoryjne wykonano uznanymi metodami a następujące po sobie analizy mają postać logicznego cyklu badawczego. Rozdział ten jest czytelny a wskazane na jego początku zestawy wszystkich użytych materiałów i odczynników czynią go syntetycznym opracowaniem. Jakość opisów tej części dysertacji wskazuje na bardzo dobre przygotowanie Autorki w zakresie analityki biochemicznej.

Metody statystyczne użyte do analizy otrzymanych wyników zostały dobrane i wykorzystane prawidłowo. **Proszę jednak o uzasadnienie wyboru testu Scheffégo do szacowania istotności różnic. Zazwyczaj w badaniach biologicznych i medycznych używa się nieco mniej konserwatywnego testu Duncana czy też Tukey'a.**

Rozdziały:

Omówienie wyników i Dyskusja

Autorka przedstawiła uzyskane wyniki w sposób bardzo syntetyczny, co nadaje im przejrzystości. Zostały one umieszczone w czytelnych tabelach i na wykresach, które stanowią kwintesencję tego rozdziału.

Kolejność omawianych wyników jest analogiczna do opisu zawartego w rozdziale „Materiał i metody". W pierwszej kolejności omówiono wyniki aktywności antybakteryjnej i przeciwgrzybiczej badanych jadów. Do testu wybrano *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli, Proteus*

mirabilis, Pseudomonas aeruginosa oraz *Candida albicans*. Zestawienie to jest prawidłowe, gdyż Dysertantka wybrała gatunki wieloantybiotykooporne i stanowiące wyzwanie dla jednostek służby zdrowia. Wyniki dotyczące tej części pracy są bardzo ciekawe a dane wskazujące na promotorstwo wzrostu badanych jadów względem *Proteus mirabilis* i *Candida albicans* zmuszające do dyskusji naukowej. Kolejny podrozdział dotyczy rezultatów w zakresie analizy molekularnej białek tych jadów. Są to wyniki pilotażowe, wstępne, dające informację, jak wielkich cząsteczek należy szukać przy pełnej identyfikacji białek zawartych w jadach obu żmij.

Ostatnią częścią opisanych wyników jest określenie cytotoksyczności względem dwóch linii komórkowych ludzkiego czerniaka skóry A375 oraz MeWo. Efektem ostatecznym tych analiz jest wyznaczenie przez Autorkę poziomów IC_{50} oraz poparcie to zdjęciami z analiz mikroskopowych.

Dyskusja zawarta w osobnym rozdziale została przedstawiona prawidłowo. Jej konstrukcja opiera się na przedstawieniu najważniejszych wyników uzyskanych przez Autorkę, odniesieniu ich do skromnych źródeł literatury w zakresie badanego zagadnienia oraz wykazaniu potencjalnych różnic aktywności badanego materiału wynikających ze zmienności gatunkowej. Czytając ten rozdział szukałem dyskusji dotyczącej wyników wskazujących na promotorstwo wzrostu badanych jadów względem *Proteus mirabilis* i *Candida albicans*. W tym miejscu jestem zmuszony zgodzić się z Doktorantką, że literatura w tym zakresie jest skąpa a wyniki do tej pory opisane uzyskiwano metodą dyfuzyjno-krążkową, posiadającą pewne ograniczenia. **Nie mogę natomiast zgodzić się z tezą zawartą na stronie 95 (ostatni akapit), gdzie Autorka wyjaśnia, że za promotorstwo wzrostu *Proteus mirabilis* odpowiada zjawisko nadtrawienia przez jady węży pożywki, czyniąc ją bardziej dostępną dla bakterii. Gdyby tak było, efekt ten występowałby również w przypadku pozostałych badanych bakterii, a mieliśmy tu do czynienia z hamowaniem ich wzrostu w obecności badanych jadów. Proszę Autorkę o odniesienie się do tej uwagi.**

Reasumując, rozdział ten jest opracowany rzetelnie i nie jest on tylko konfrontacją wyników własnych z rezultatami uzyskanymi przez innych badaczy. Zawiera spostrzeżenia autorskie a ich źródłem jest wnioskowanie przyczynowo-skutkowe oparte o uzyskane wyniki prac badawczych.

Wnioski

W rozdziale tym Doktorantka w sposób bardzo jasny przedstawiła najważniejsze wyniki i wnioski z nich płynące. Wnioski te są konkretne, oddając jednocześnie szczegóły tychże wyników, które należy uznać za ważne i wartościowe.

Piśmiennictwo

Autorka przedstawiła 188 pozycji literatury (krajowej i zagranicznej), z której znaczna ilość pochodzi z ostatnich dziesięciu lat. Dobór piśmiennictwa jest prawidłowy, poszczególne pozycje są w pełni wykorzystane w tekście dysertacji. Prace są właściwie cytowane, tzn. podane są pełne ich tytuły oraz zakres stron cytowanych artykułów.

Podsumowanie recenzji i wniosek końcowy

Oceniany cykl analityczny był bardzo trudny do przeprowadzenia, z uwagi na szeroki jego zakres. Wymagał on dużej wiedzy i nakładu pracy. Dysertantka wykazała się dobrym teoretycznym i praktycznym przygotowaniem, staranną organizacją warsztatu badawczego oraz znajomością odpowiednich technik analitycznych, szczególnie w zakresie mikrobiologii i badań na liniach komórkowych.

Wymienione z obowiązku recenzenta niedociągnięcia i usterki powinny być uwzględnione przy przygotowywaniu pracy do publikacji. Mają one charakter dyskusyjny. Nie umniejszają one merytorycznej wartości pracy, którą ogólnie oceniam bradzo dobrze. Rozprawa wnosi do nauki istotne elementy poznawcze, jej tematyka jest bardzo aktualna, szczególnie w aspekcie coraz bardziej postępującej antybiotykoodporności i wzrostu przypadków nowotworów u ludzi. Praca ta ma również wysoką wartość dla nauk biologicznych.

Mimo drobnych i nieznacznych mankamentów, w mojej opinii praca spełnia kryteria dla dysertacji doktorskich określonych 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 *Dyscypliny Nauki o Zdrowiu, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu*** o dopuszczenie *lek. wet.* ***Małgorzaty Tarnowskiej*** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na nowatorski charakter badań, oryginalnego podejścia do tematu oraz bardzo starannego opracowania dysertacji wnoszę również do **Wysokiej Rady *Dyscypliny Nauki o Zdrowiu, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu*** o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani *lek. wet.* ***Małgorzaty Tarnowskiej***.

Wrocław, 22 kwietnia 2022 r.

dr hab. inż. Mariusz Korczyński,

prof. uczelni