

Prof. dr hab. n. farm. Adam Buciński
Katedra i Zakład Biofarmacji
Collegium Medicum UMK
ul. Jurasza 2, 58-094 Bydgoszcz

Bydgoszcz, 17 lutego 2018 r.

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr. Pawła Drągowskiego

pt.: „Rola tlenu węgla w regulacji apoptozy w komórkach raka sutka MCF-7”

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr. Pawła Drągowskiego została wykonana w Samodzielnej Pracowni Analizy Leków Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem dr. hab. n. farm. Wojciecha Miltka. Ma ona układ typowy dla prac eksperymentalnych i, nie licząc strony tytułowej, zawarta jest na 101 stronach maszynopisu. Na początkowych stronach znajdują się podziękowania dla Promotora pracy i Współpracowników Doktoranta, spis treści oraz pomocny wykaz stosowanych w tekście skrótów. Właściwa część dysertacji rozpoczyna się dobrze napisanym *Wstępem*, w którym Doktorant przybliżył tematykę swojej pracy. Odnajdziemy tam szereg istotnych informacji odnoszących się do apoptozy, jej szlaków oraz czynników ją pobudzających. Kolejne strony przeznaczono kolagenowi. Opisano na nich jego budowę i znaczenie w metabolizmie komórkowym, omówiono czynniki regulujące jego metabolizm. Przybliżono funkcje prolidazy w organizmie oraz jej rolę w biosyntezie kolagenu. Kolejne strony *Wstępu* poświęcono tlenkowi węgla, jego toksyczności, endogennej biosyntezie oraz jego znaczeniu w procesach fizjologicznych. Znaczny fragment pracy Autor przeznaczył syntetycznym donorom tlenu węgla - CORM. Po zapoznaniu się ze *Wstępem* pracy, nie mam wątpliwości, że Doktorant dobrze rozeznał się w swojej tematyce badawczej. Świadczy o tym zarówno dobry język i umiejętność syntetycznego przedstawienia ważnych, niełatwych zagadnień z tego obszaru badań, jak i dokonany rzetelny przegląd piśmiennictwa specjalistycznego, liczący dla tej części pracy 140 pozycji.

Na kolejnej stronie dysertacji przedstawiony został cel pracy, który zakłada zbadanie wpływu donora tlenu węgla (CORM-2) na podstawowe procesy zachodzące w komórkach nowotworowych gruczołu piersiowego MCF-7, związane z metabolizmem kolagenu w aspekcie regulacji procesu apoptozy. Należy podkreślić, że cel pracy został dobrze sformułowany i, co ważniejsze, odnosi się do nowych, nie opisanych jeszcze w literaturze zagadnień, dotyczących roli tlenu węgla w regulacji metabolizmu kolagenu oraz apoptozy w komórkach nowotworowych gruczołu piersiowego MCF-7. Temat pracy zaintrygował mnie, z dużym więc zainteresowaniem zapoznałem się z jej treścią.

Kolejny rozdział, to *Materiały i metody*. W tej części przedstawione zostały wszystkie zastosowane przez Autora materiały, w tym odczynniki i użyte do badań komórki MCF-7, wraz z informacją skąd materiały te pochodziły. Szczegółowo opisano metody przygotowania hodowli komórek raka sutka, przeprowadzone badania cytotoksyczności, pomiar biosyntezy DNA, oznaczanie zawartości białka, aktywności prolidazy, pomiar biosyntezy kolagenu, analizę poziomu tioli komórkowych oraz pomiar aktywności białek przekąźnikowych uczestniczących w regulacji przeżywalności komórek. Na uwagę zasługuje wykorzystanie nowoczesnych metod i narzędzi badawczych oraz szeroki zakres badań, jakich podjął się Doktorant, by zrealizować cel pracy. Trochę niedosytu odczułem w części poświęconej analizie statystycznej. Do tego wątku powrócę w dalszej części mojej opinii.

Rezultaty przeprowadzonych badań zostały zawarte w części *Wyniki*, na kolejnych 29 stronach. Dane uzyskane z wykonanych pomiarów przedstawiono na 18 rycinach i uzupełniono komentarzami. Ten fragment pracy świadczy nie tylko o dobrym przygotowaniu teoretycznym do tematyki badawczej, ale również o predyspozycji do pracy eksperymentalnej. Ta część tekstu jest przejrzysta i dobrze napisana. Trzeba przyznać, że sposób przedstawienia przez Autora wyników eksperymentów wraz z nawiązaniem do metodyki ułatwia czytelnikowi poruszanie się po tekście pracy. Analizując ten rozdział, nasunęły mi się pewne uwagi, do których odniosę się później.

Na dalszych kartach pracy znajduje się *Dyskusja*. Po zapoznaniu się z jej tekstem uważam, że jest to rzeczowe i wyważone studium nad wynikami przeprowadzonych pomiarów. Doktorant dokonał tam syntetycznej, dojrzałej oceny rezultatów wykonanych badań, popartej właściwie dobranym piśmiennictwem. Ta część dysertacji potwierdza

Jego umiejętności do prowadzenia krytycznej oceny danych oraz korzystania z piśmiennictwa specjalistycznego.

Na kolejnej stronie odnajdziemy *Wnioski*. Wysłunięte tu konkluzje są uzasadnione i mają odzwierciedlenie w przeprowadzonych badaniach. Doktorant wykazał, że donor tlenku węgla CORM-2 powoduje zależne od dawki obniżenie przeżywalności komórek MCF-7, obniżenie biosyntezy kolagenu i ekspresji receptorów β_1 -integrynowych i IGF-I. Donor ten indukuje apoptozę, co można powiązać ze zwiększeniem ekspresji aktywnych kaspaz 9 i 3. Przeprowadzone badania wykazały również hamujący wpływ CORM-2 na proces autofagii w badanych komórkach raka sutka.

Na kolejnych czterech stronach rozprawy odnajdziemy streszczenie napisane w języku polskim i angielskim. Należy zaznaczyć, że jest to ważny element rozprawy, wymaga bowiem od Autora takiego jej zaprezentowania, by zachęcić osobę czytającą do dalszej lektury. Uważam, że zadanie to Doktorant wykonał bardzo dobrze.

Ostatni element dysertacji to *Piśmiennictwo*, liczące 179 pozycji. Dobór tych pozycji, jak i ich użycie w tekście potwierdza, że Doktorant dogłębnie zapoznał się z aktualnym stanem wiedzy dotyczącym tematyki, którą zajmował się w swojej pracy doktorskiej. Prace tam zawarte zostały opublikowane w okresie od 1951 do 2017 roku, przy czym zdecydowaną większość stanowią prace, które ukazały się po roku 2000.

Po zapoznaniu się z całym tekstem rozprawy muszę przyznać, że praca, pomimo złożonej tematyki, została napisana starannie, dobrym w odbiorze językiem. Sposób zaplanowania pracy eksperymentalnej, umiejętne zastosowanie metod i narzędzi badawczych oraz sprawność w interpretacji uzyskanych danych, dobrze świadczą o Kandydacie ubiegającym się o stopień naukowy doktora.

Pomimo dokonanej autokorekty, nie udało się Doktorantowi ustrzec drobnych błędów edytorskich. Z obowiązku recenzenckiego przedstawię kilka z nich. W rozdziale dotyczącym tlenku węgla podrozdział *Toksyczność CO* ma tę samą numerację (3.1.) co podrozdział *Materiały* (3.1.) w rozdziale *Materiały i metody*. Podobnie jest z podrozdziałami *Endogenna biosynteza tlenku węgla* i *Metody*, którym przypisano numerację 3.2.. We *Wstępie*, na stronie 10, w ostatnim wersie, zamiast „do nich” jest „do niech”. Na stronie 13, w przedostatnim wersie tekstu, napisano: „Typy V i IX tworzą rdzenie włókien” zamiast „tworzą”. W części *Metody*, na stronie 41, w wersie 8, zamiast „scyntylicacyjnych” jest „scyntylacyjnych”. W rozdziale *Wyniki*, na rycinie 11, nie

przedstawiono danych odnoszących się do stężenia 200 μM CORM-2, mimo że do tej wartości stężenia odnosi się komentarz Autora przedstawiony na stronie 48, a wartość ta występuje również w opisie pod ryciną. Podobna sytuacja dotyczy ryciny 20. Na stronie 57, w trzecim zdaniu od końca, napisano: „ β_1 -integrynowymi” zamiast „ β_1 -integrynowego”, a w wersji niżej: „receptorza” zamiast „receptora”.

Teraz powrócę do wspomnianych wcześniej uwag dotyczących *Analizy statystycznej* i *Wyników*. Doktorant do oceny wyników zastosował test *t*-Studenta, a odniesieniem była wartość kontrolna. Z uwagi na brak informacji dotyczących spełnienia założeń dla tego testu nasuwa się pytanie, czy zmienne charakteryzowały się rozkładem zbliżonym do normalnego i czy spełnione było założenie homogeniczności wariancji. Czy założenia te były sprawdzone przez Doktoranta, czy też zastosowanie tego testu oparte było na innych przesłankach, na przykład literaturowych? W tekście pracy pada stwierdzenie, że badany efekt zależy od dawki. Dlaczego więc nie została wykonana analiza wariancji, która często stosowana jest jako "rozszerzenie" dla testu *t*-Studenta, który ma zastosowanie do oceny różnic pomiędzy tylko dwiema grupami. Analiza wariancji takich ograniczeń nie ma i pozwala porównać ze sobą więcej niż dwie grupy. Razem z testami porównań wielokrotnych (tzw. post-hoc) pozwala wykazać występowanie istotnej statystycznie różnicy nie tylko w odniesieniu do grupy kontrolnej, ale również pomiędzy wszystkimi badanymi grupami. Takie podejście pozwoliłoby na uzyskanie dodatkowych informacji w oparciu o już posiadane dane eksperymentalne.

Doktorant w tekście pracy odnosi się do efektów występujących przy większych stężeniach donora CO niż 100 μM , o czym wspominałem już przy uwagach dotyczących rycin. Takich odniesień jest więcej, np. na stronie 80 odnajdziemy zdanie: „Dodatkowo zaobserwowałem, że stężenie 200 μM i wyższe powodowało nekrozę badanych komórek nowotworowych”. Zagadnienie dotyczące wpływu większych stężeń CORM-2 powinno być dokładniej omówione i uwzględniać prezentację danych eksperymentalnych.

Chciałbym podkreślić, że wymienione uwagi nie wpływają negatywnie na moją całościową opinię o pracy, którą oceniam wysoko. Mam nadzieję, że staną się one przyczynkiem do ciekawej dyskusji podczas publicznej obrony.

Po dokładnej analizie tekstu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. Pawła Drągowskiego, mimo złożonej tematyki, napisana została dobrym, zrozumiałym

w odbiorze językiem i stanowi oryginalne osiągnięcie Autora, wnoszące nowe istotne dane dotyczące roli tlenu węgla w regulacji apoptozy w estrogenozależnych komórkach raka sutka MCF-7. Cel pracy został precyzyjnie zdefiniowany, badania prawidłowo zaplanowane i wykonane. Na uwagę zasługuje umiejętne zastosowanie metod i narzędzi badawczych oraz waga podjętej problematyki. Przeprowadzona przez Autora dyskusja jest dojrzała, poparta wynikami wykonanych pomiarów i piśmiennictwem specjalistycznym. Wszystko to świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu i predyspozycji Doktoranta do pracy naukowej.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, że oceniana praca doktorska mgr. Pawła Drągowskiego pt.: „Rola tlenu węgla w regulacji apoptozy w komórkach raka sutka MCF-7” spełnia ustawowe wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 ze zm.). Tym samym wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr. Pawła Drągowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Katedry i Zakładu Biofarmacji
prof. dr hab. Adam Buciniski