



**KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII
I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
UNIwersYTET MEDYCZNY W LUBLINIE**

20-093 Lublin, ul. dr W. Chodźki 1
tel. fax 48 (81) 742-37-93

Lublin, 12.09.2014

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Ewy Langner pt.

„Ocena potencjału chemoprewencyjnego melanoidyn izolowanych z ogrzewanego włókna ziemniaczanego typu Potex. Badania *in vitro* w komórkowym modelu glejaka i raka jelita grubego”

Choroby nowotworowe są wyzwaniem współczesnej medycyny. Mimo ogromnego postępu zapobieganie powstawania nowotworów i różnego rodzaju leczenie chirurgiczne, farmakologiczne, czy radioterapia często nie przynoszą oczekiwanych, dobrych rezultatów. Dlatego podejmowanie badań dotyczących potencjału chemoprewencyjnego szeregu substancji naturalnych i ich modyfikowanych składników w celu zapobiegania powstawania, jak również opóźniania lub hamowania już toczącego się procesu nowotworowego jest ze wszech miar wskazane.

W ten nurt badań wpisuje się przedłożona do oceny rozprawa Pani Ewy Langner. Stanowi ona raport z badań Autorki dotyczących ustalenia potencjału chemoprewencyjnego ekstraktu oraz melanoidyn izolowanych z ogrzewanego włókna ziemniaczanego typu Potex w komórkowym modelu glejaka i raka jelita grubego *in vitro*.

Wyniki pracy doktorskiej zostały w części opublikowane uprzednio (2009, 2011, 2013) w uznanych czasopismach międzynarodowych. Doktorantka jest pierwszym Autorem tych wszystkich prac, co świadczy o jej dominującym wkładzie w ich wykonanie i przygotowanie do publikacji. Zostało to pisemnie potwierdzone przez wszystkich pozostałych autorów, którzy nie wnoszą sprzeciwu co do wykorzystania tych danych jako składnika recenzowanej rozprawy doktorskiej. Dodatkowo, Doktorantka uzyskała formalną zgodę wydawnictwa Elsevier na przedruk lub ponowne wykorzystanie wybranych rycin w pracy doktorskiej, co świadczy o należytej staranności Pani Ewy Langner w przestrzeganiu formalno-etycznych wymagań w pracy naukowej.

Rozprawa doktorska o typowym układzie dla prac doświadczalnych liczy 125 stron i została podzielona na 9 rozdziałów, w tym streszczenia pracy w języku polskim i angielskim. Tekst uzupełniony został 10 tabelami i 31 rycinami. Praca została wzbogacona o **wykaz używanych skrótów** i symboli stanowiące użyteczny dla czytelnika odnośnik do tekstu.

Obszerny **Wstęp** zawarty na stronach 12-38 zaczyna się krótkim, ale treściwym wprowadzeniem w zagadnienia chemoprewencji nowotworów i potencjalnym zastosowaniem substancji pochodzenia roślinnego, w tym błonnika i jego produktów obróbki termicznej, włączając melanoidyny, jako środków chemoprewencyjnych.

Rozdział ten zawiera również aktualne dane na temat klasyfikacji, etiologii i patogenezы nowotworów, z których pochodzą linie komórkowe użyte w przeprowadzonych eksperymentach, - zarówno glejaków mózgu, jak i raka jelita grubego. Z obowiązku recenzenta muszę zauważyć, że w podrozdziale „*Molekularne uwarunkowania istotne dla leczenia glejaków*” brak mi odniesienia dlaczego opisywane zmiany genetyczne są istotne dla leczenia tego rodzaju nowotworów, natomiast w klasyfikacji raka jelita grubego używa się oznaczenia stopnia zaawansowania klinicznego od I do IV, a nie O-IV, jak podaje Doktorantka, choć rzeczywiście niektórzy autorzy stosują nieformalny stopień „0” jako odniesienie do raka *in situ*.

W dalszej części **Wstępu** Pani mgr Ewa Langner szczegółowo omawia zagadnienie chemoprewencji przy użyciu substancji chemicznych z pożywienia. Na uwagę zasługuje zebranie wielu danych w formie Tabeli nr 1, przejrzyste i w skondensowany sposób przedstawiającej rodzaj substancji chemoprewencyjnych, źródło ich pochodzenia oraz potencjalny mechanizm działania w komórkach nowotworowych. Następnie Autorka rozwinęła zagadnienie roli błonnika i jego pochodnych w tym zakresie, co jest w pełni zrozumiałe ze względu na dalsze wyniki pracy doktorskiej. Omawia również szeroko znaczenie melanoidyn, źródła ich występowania, aktywność biologiczną tych związków i potencjalne działanie bakteriostatyczne, probiotyczne, czy modulujące transformację ksenobiotyków. Wspomina również o wpływie melanoidyn na proliferację i wzrost komórek nowotworowych.

Generalnie, „**Wstęp**” jest obszernym i przejrzystym wprowadzeniem w problematykę zagadnień podejmowanych w rozprawie doktorskiej, choć Autorka nie ustrzegła się drobnych błędów literowych, kilku niezbyt zręcznych sformułowań, czy powtórzenia bardzo podobnych fragmentów tekstu na stronie 27 i 28, czego powinna moim zdaniem unikać.

Cel pracy była ocena potencjału chemoprewencyjnego ekstraktu oraz melanoidyn izolowanych z ogrzewanego włókna ziemniaczanego typu Potex w komórkowym modelu glejaka i raka jelita grubego *in vitro*. Wybór tematu badań i sposobów jego realizacji nie budzi zastrzeżeń.

Materiał i metody stosowane w pracy zostały opisane w rozdziale 3. Konstrukcja badania jest czytelna, a zastosowana metodyka jest adekwatna do wytyczonego celu i spełnia wymogi nowoczesności wymagane w badaniach z tego zakresu. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na pewne nieścisłości.

Na stronie 47, w opisie testu oznaczania proliferacji komórek (BrdU), Autorka pisze: „*podłoże wymieniano na świeże bez dodatku (kontrola) lub z dodatkiem badanego ekstraktu w stężeniach: 1, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml i inkubowano przez 96 godzin w warunkach standardowych. Po 48 godzinach inkubacji, dodawano roztwór BrdU i postępowano zgodnie z zaleceniami producenta*”, która to procedura była zakończona po kilku godzinach, tak więc można przyjąć, że inkubacja komórek

nowotworowych z dodatkiem ekstraktu trwała faktycznie 48, a nie 96 godzin., co znajduje potwierdzenie w prezentowanych później wynikach.

Na stronie 48 w opisie „*Oznaczanie cytotoksyczności (test LDH)*”, Doktorantka pisze, że „*zastosowano test oparty na pomiarze stężenia dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w podłożu hodowlanym*”, podczas gdy istota tego eksperymentu polega na pomiarze przyrostu produktu reakcji, katalizowanej przez badany enzym, co świadczy o jego aktywności, a jedynie pośrednio o jego stężeniu.

Podobnie, na stronie 49, w opisie zymografii Autorka rozprawy używa sformułowania „*W celu detekcji metaloproteinaz po przeprowadzonej elektroforezie, żele barwiono błękitem Coomassie, co umożliwiło wizualizację jasnych prążków na ciemnym tle, powstałych w miejscach proteolizy żelatyny*”, podczas gdy w rzeczywistości ocenie podlegał jedynie efekt ich działania. Dodatkowo, dyskusyjne jest użycie w eksperymencie 2% surowicy w medium hodowlanym, gdyż surowica zawiera sama w sobie duże stężenia i wykazuje aktywność metaloproteinaz, co może kamuflować prawdziwe wyniki aktywności MMP z komórek przez te zawarte w surowicy. Sugerowałbym powtórzenie tego typu eksperymentów z użyciem medium bez surowicy.

Przy analizie cyklu komórkowego nie znalazłem nazwy oprogramowania, które było użyte do tego celu, a przy opisie badań immunocytochemicznych informacji, czy były przeprowadzone kontrole negatywne – z użyciem tylko przeciwciała drugorzędowego, aby wykluczyć niespecyficzne wiązanie tego przeciwciała z preparatem.

Są to jednak drobne uwagi, które w żaden sposób nie wpływają na generalną, wysoką ocenę części metodycznej.

Analiza statystyczna nie budzi zastrzeżeń. Przyjęte testy statystyczne nie odbiegają od standardów światowych, a ich wybór należy uznać za odpowiedni.

Wyniki wykonanych pomiarów przedstawiono w sposób czytelny i jasny ułatwiający czytelnikowi dysertacji poruszanie w licznych i złożonych analizach zależności. Dane te zostały starannie zobrazowane w postaci licznych tabel i wykresów z zaznaczonymi wynikami analizy statystycznej. Badania typu Western-blot wzbogacono wykresami densytometrycznymi.

Autorka wykazała, że ekstrakt ogrzewanego błonnika ziemniaczanego Potex, w sposób zależny od stężenia hamuje żywotność/ proliferację różnych typów komórek nowotworowych *in vitro*, a równocześnie wykazuje brak cytotoksyczności wobec prawidłowych komórek linii CCD841 CoTr, OLN-93 oraz fibroblastów skóry ludzkiej HSF. Tu mam jedną uwagę:

Badania cytotoksyczności ekstraktów względem komórek prawidłowych badano testem LDH, natomiast przeżywalność komórek nowotworowych badano testem MTT, co uniemożliwia jednoznaczne porównanie. Cennym uzupełnieniem przeprowadzonych eksperymentów byłaby ocena przeżywalności komórek prawidłowych testem MTT.

W dalszej części tego rozdziału na podstawie przeprowadzonych eksperymentów Doktorantka stwierdza, że badane ekstrakty nie wpływają na zdolności migracyjne analizowanych komórek nowotworowych oraz nie indukują apoptozy. Powodują natomiast hamowanie przebiegu cyklu komórkowego, czego logiczną konsekwencją były następne eksperymenty wykonane przez Autorkę rozprawy. Wykazała ona, że ekstrakt ogrzewanego włókna ziemniaczanego Potex wpływa na

ekspresję białek i genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego oraz aktywację szlaków sygnałowych zaangażowanych w procesy wzrostu i proliferacji komórek, w tym głównie szlaków kinaz typu MAP oraz kinazy GSK-3 β i Akt.

Pewne zastrzeżenia budzi odniesienie stopnia fosforylacji (a w związku z tym i aktywacji) kinaz GSK-3 β , p38 oraz SAPK/JNK do beta-aktyny, szczególnie badanych w długich przedziałach czasowych (do 48 godzin). W tym czasie może dojść do zmian w ekspresji białek enzymatycznych, co zresztą Doktorantka prezentuje w przypadku kinaz CDK4/6. W związku z tym obserwowane zmiany fosforylacji mogą wynikać ze zmniejszonej zawartości białek enzymatycznych, a nie z powodu ich zmniejszonej fosforylacji i aktywacji. Aby uniknąć tego typu zarzutów membrany powinny być inkubowane ponownie z przeciwciałami rozpoznającymi całkowite, ufosforylowane i nieufosforylowane formy kinaz, tak jak to zostało wykonane w przypadku analizy aktywności kinaz ERK1/2 i Akt.

Doktorantka wykazała również, że zarówno frakcja melanoidyn wysokocząsteczkowych, jak i frakcja związków niskocząsteczkowych izolowanych z ekstraktu, są zaangażowane w anty-proliferacyjną aktywność ekstraktu ogrzewanego błonnika Potex, wskazując jednocześnie na większą aktywność frakcji HMW w komórkach glejaka linii C6, a frakcji LMW w komórkach raka jelita grubego linii LS180.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że uzyskane wyniki są unikalne i bardzo wartościowe w świetle innych doniesień.

Dyskusja przedstawionej do recenzji dysertacji świadczy o swobodnym poruszaniu się Autorki w zagadnieniu będącym przedmiotem rozprawy doktorskiej. Zawarte w dyskusji informacje w sposób rzeczowy i wiarygodny porównują uzyskanie wyniku z danymi zaczerpniętymi z piśmiennictwa. Doktorantka formułuje odważne hipotezy, popierając je wynikami badań własnych oraz dostępnych w piśmiennictwie.

Wnioski wynikają z konstrukcji badania i są uzasadnione, choć w pewnej mierze stanowią raczej ponowne streszczenie wyników, poza wnioskiem numer 8. Ten ostatni w mojej ocenie jest właśnie typowym wnioskiem, stanowi podsumowanie pracy i kreśli kierunki postępowania w przyszłości.

Piśmiennictwo zawierające 287 pozycje jest adekwatne i świadczy o umiejętności selekcjonowania istotnych informacji związanych z podjętym tematem badań. Umieszczone pozycje piśmiennictwa są aktualne i znajdują się w bazach danych czasopism naukowych. Większość pozycji pochodzi z ostatnich lat (177 pozycji z ostatniej dekady, 67 pozycji z lat 2009-2014), pozostałe posiadają kluczowe znaczenie dla redakcji wstępu lub zawierają oryginalne opisy stosowanych metod badawczych. Proponowałbym uzupełnić niektóre cytowania w tekście – np. strona 1 – [WHO] – odpowiedni odnośnik strony internetowej powinien się znaleźć w spisie piśmiennictwa. Pewnym niedopatrzeniem jest też powoływanie się na bliżej niesprecyzowane „materiały promocyjne” jednej z firm komercyjnych bez podania ich źródła w postaci pozycji książkowej lub linku do strony internetowej.

Konkludując stwierdzam, że przedmiot prowadzonych badań, dobór metod, prezentacja wyników, rzeczowość dyskusji oraz uzyskane wnioski odpowiadają kryteriom stawianym pracom doktorskim. Na szczególne podkreślenie zasługuje podjęta tematyka badań oraz biegłość doktorantki w wykorzystaniu przedstawionych metod i dojrzała analiza uzyskanych wyników.

W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Ewy Langner do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje również o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej

Z poważaniem:

Andrzej Stepulak

Kierownik Katedry i Zakładu
Biochemii i Biologii Molekularnej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
dr hab. n. med. Andrzej Stepulak