

25.06.2022

Piekary Śląskie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Gajdy pt. „Reaktywne formy tlenu w przebiegu cyklu komórkowego i odpowiedzi komórek prawidłowych i nowotworowych na promieniowanie jonizujące”, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Rzeszowskiej.

Przeglądając dorobek mgr Karoliny Gajdy mam wrażenie, że tematem wolnych rodników, ekspresji genów i wpływem promieniowania na komórki, zajmuje się co najmniej od 10 lat a rozprawa doktorska jest podsumowaniem Jej umiejętności prowadzenia badań eksperymentalnych z zastosowaniem różnorodnych technik badawczych.

W prezentowanej pracy przeprowadziła szereg badań na 8 liniach komórkowych, w tym na 7 liniach komórek nowotworowych i jednej linii fibroblastów ludzkich. Analizowała przebieg ich cykli komórkowych, badała zmiany stężeń wolnych rodników i anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach w trakcie ich hodowli i pod wpływem czynników zmieniających cykle komórkowe. Szukała źródła wolnych rodników w komórkach badając mitochondria i ekspresję genów zaangażowanych w przebieg i regulację cyklu komórkowego. Jako egzogenną przyczynę tworzenia wolnych rodników w komórkach zastosowała promieniowanie jonizujące i zbadała rolę wielkości dawki i czasu promieniowania na populacje badanych komórek. Oceniała nasilenie apoptozy i nekrozy po ekspozycji badanych populacji komórek na promieniowanie oraz stężenia wolnych rodników w komórkach.

Przeczytałem tę szeroko pomyślaną pracę z dużym zainteresowaniem i z pełnym podziwem dla zakresu zastosowanych technik badawczych, które miały udowodnić założenia w przyjętym celu pracy.

Rozprawa liczy 148 stron o układzie typowym dla prac doktorskich. Po spisie treści Autorka podała źródła finansowania badań i wykaz rozdziałów w książkach i publikacji, w których zostały wykorzystane wyniki badań wykonanych w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej. Po liście skrótów zamieściła streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim.

W 27 stronicowym Wstępie Doktorantka omawia mechanizm przebiegu cyklu komórkowego, szczegółowo wymienia czynniki kontrolujące przejścia między fazami cyklu. Na dwóch rycinach ilustruje przebieg cyklu komórkowego,

oddziaływanie białek regulatorowych w poszczególnych fazach i reakcję na uszkodzenia DNA.

Kolejnym etapem jest omówienie powstawania i roli wolnych rodników w komórkach. Wymienia ich rodzaje, źródła i ich udział w funkcjonowaniu komórki, co ilustruje odpowiednimi rycinami. Podsumowaniem jest fragment poświęcony wpływowi wolnych rodników na przebieg cyklu. Poprzedza on omówienie wpływu promieniowania jonizującego na procesy komórkowe i wprowadzenie do zasad radioterapii.

Celem pracy jest zbadanie powiązań między regulacją produkcji i neutralizacji reaktywnych form tlenu w komórce a przebiegiem cyklu komórkowego oraz zbadanie wpływu promieniowania jonizującego, jako egzogennej przyczyny, na powstawanie wolnych rodników.

Dla zrealizowania tak szeroko przyjętego celu pracy Doktorantka wyznaczyła aż 8 pośrednich celów badawczych.

Precyzują one szczegółowo poszczególne etapy pracy i określają rodzaje technik badawczych, które Doktorantka ma zamiar zastosować.

Materiał i Metody to szczegółowe i profesjonalne omówienie 8 linii komórkowych, warunków ich hodowli, napromieniania, i regulacji cykli komórkowych, ilustrowane zestawieniem w tabeli trzech metod blokowania cyklu.

Kolejnymi wśród tych licznych metod badawczych to: ilościowe oznaczanie komórek wykazujących markery proliferacji, zmiany w cyklu komórkowym oraz komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Następną grupą badań to oznaczanie liczby i odsetka komórek wykazujących produkcję reaktywnych form tlenu i anionorodnika nadadtlenkowego metodą barwienia fluorescencyjnego i odczytu w cytofluorymetrze przepływowym. Podobną metodę zastosowała Doktorantka do oznaczania potencjału jonowego błony mitochondrialnej i masy mitochondriów w poszczególnych komórkach.

Dla zbadania ekspresji genów związanych z sferą redoxy komórek w fazie G1 i G2 w komórkach HCT116, raka jelita grubego, zastosowała metodę mikromacierzy. A na zakończenie tego rozdziału zaprezentowany został system reporterowy FUCCI przyżyciowego badania cyklu komórkowego. Przy jego pomocy Autorka mogła rozróżnić komórki znajdujące się w poszczególnych fazach cyklu. Badanie przeprowadziła na dwóch liniach komórkowych HCT116 i HEPA. Natomiast do badania długości cyklu wykorzystwała komórki linii Hela znakowane genem zielonej fluorescencji. Komórki umieszczano w układzie mikrofluidów i przepuszczano przez okres 162 godzin przez mikroskop fluorescencyjny, który co godzinę wykonywał zdjęcia komórek dokumentując poszczególne fazy cyklu komórkowego.

Chciałbym wyraźnie podkreślić staranność przeprowadzonego eksperymentu i zastosowanie do analizy wyników właściwie dobranych metod statystycznych.

Rozdział Wyniki to 49 stronicowa prezentacja otrzymanych wyników badań. Przedstawienie wyników jest czytelne, dobrze zaprezentowane graficznie za pomocą licznych wykresów, tabel i zdjęć.

Dyskusję rozpoczyna co prawda zdanie nawiązujące do zasadniczego celu pracy ale dalsze fragmenty stanowią analizę poszczególnych etapów pracy eksperymentatora. Pierwsza część to analiza hodowli i cykli komórkowych wybranych do badania linii komórkowych. Dobór warunków hodowli, obserwacja przebiegu cykli komórkowych w zależności od sposobu pasażowania pozwoliły na ustalenie podstawowych warunków synchronizacji hodowli.

Druga część dyskusji to analiza obserwacji aktywności wolnorodnikowej i pomiaru zawartości wolnych rodników w przebiegu cykli komórkowych w poszczególnych liniach. Porównanie wyników pomiarów całkowitej zawartości reaktywnych form tlenu z obecnością anionorodnika ponadtlenkowego wykazała zmiany zależne od fazy cyklu. Wdrożenie synchronizacji hodowli badanych linii udowodniło, że komórki linii nowotworowych wytwarzają najwięcej wolnych rodników w fazie G2/M a komórki prawidłowe w fazie G1. Fakt ten zrodził pytanie o charakter ekspresji genów lub białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego i syntezę lub neutralizację aktywności wolnorodnikowej. Uzyskane wyniki badań ekspresji genów wykazały, że komórki linii HCT116 charakteryzują się większą aktywnością genów kodujących białka produkujące anionorodnik ponadtlenkowy i zmniejszoną genów kodujących enzymy neutralizujące ten rodnik. W tym zakresie, nowym nie opisywanym jeszcze w piśmiennictwie zjawiskiem jest zaobserwowany spadek stężeń anionorodnika w fazie G2 w komórkach HCT116, Ca46 i K562. Zdaniem Autorki może to być wynikiem zmian w ekspresji lub aktywności syntazy tlenu azotu, która w zmieniających się warunkach oksydo-redukcyjnych może także produkować anionorodnik. Ważnym fragmentem dyskusji jest analiza i omówienie odpowiedzi komórek na promieniowanie jonizujące. Doktorantka wykazała, że ekspozycja komórek na promieniowanie jonizujące wywołała wzrost zawartości rodników tlenowych i zmiany w przebiegu cyklu komórkowego. W badanych liniach HCT116, K562, HL60, Ca 46 doszło do zmniejszenia proliferacji, zatrzymania cyklu w fazie G2, wzrostu częstości apoptozy i zwiększonej produkcji wolnych rodników. Natomiast komórki linii czerniaka Me45 zatrzymały się początkowo w fazie G0/G1 a następnie przyspieszyły proliferację. Dyskusję Autorka kończy podsumowaniem, w którym wypunktowała najistotniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań. Należy podkreślić, że odpowiadają one przyjętemu w celu pracy planowi badań.

Po przeczytaniu tej pracy i zapoznaniu się z bardzo bogatym i aktualnym piśmiennictwem mam podstawy do stwierdzenia, że rozprawa doktorska mgr Karoliny Gajdy jest przykładem dobrze zaplanowanego, z wyraźnie zdefiniowanym celem, badania naukowego. Doktorantka posłużyła się w nim bardzo szerokim, aktualnym zestawem technik badawczych, które konsekwentnie wdrażała realizując poszczególne etapy eksperymentu. Wykazała się doskonałą znajomością piśmiennictwa umiejętnie wykorzystanego zarówno we Wstępie jak i Dyskusji. Słusznym było również zaprezentowanie własnych publikacji związanych z realizowaną w pracy doktorskiej tematyką.

Do zadań recenzenta należy także zwrócenie uwagi na pewne niedociągnięcia spotkane w tekście. Uważam, że Doktorantka zbyt często posługuje się w pracy żargonem laboratoryjnym typu : „poziom” zamiast stężenie, „ilość” zamiast liczba, nie można także oznaczać „zmian”. Nie jestem pewien czy „zwiększona szybkość oddychania komórkowego” jest właściwym określeniem, w piśmiennictwie używa się określenia intensywność. Oczywiście te sformułowania nie umniejszają wartości pracy, raczej nadają jej laboratoryjnego kolorytu.

Na podstawie wyżej przedstawionej recenzji mogę stwierdzić, że rozprawa doktorska pt. „Reaktywne formy tlenu w przebiegu cyklu komórkowego i odpowiedzi komórek prawidłowych i nowotworowych na promieniowanie jonizujące” spełnia warunki określone w art.13 ust.7 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. z 2017r. poz. 1789) i wnoszę do wysokiej Rady o dopuszczenie mgr Karoliny Gajdy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje również o wyróżnienie rozprawy z uwagi na jej wysoki poziom badawczy i wnikliwe podejście do tematyki wolnych rodników i ich wpływu na cykle komórkowe różnorodnych linii komórek.

Prof.dr hab.n.med.Andrzej Wiczowski

Katedra Mikrobiologii i Immunologii

prof. dr hab. n. med. Andrzej Wiczowski
Kierownik Katedry