



RECENZJA

rozprawy doktorskiej pani **lek. Tatsiany DAMPS**

pt: „*Wpływ hydrolizatów wełny i wybranych substancji leczniczych na żywotność komórek raka kolczystokomórkowego skóry in vitro*”

wykonanej w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie

pod kierunkiem: dr hab. Ewy Kłodzińskiej, prof. IS-PIB jako promotora
oraz dr hab. n. med. Joanny Czuwara jako co-promotora.

Wśród wielu zagrożeń na jakie narażony jest człowiek, choroby cywilizacyjne i nowotworowe stanowią dominującą grupę. Szczególnym przypadkiem zainteresowania kosmetologów, dermatologów i onkologów są nowotworowe choroby skóry. Obok powszechnie diagnozowanego czerniaka (*melanoma*), i jego różnych odmian, rak kolczystokomórkowy skóry (*carcinoma spinocellulare*) to inwazyjny nowotwór złośliwy wywodzący się z keratynocytów. Jest on drugim pod względem częstości występowania (po raku podstawnokomórkowym) nowotworem skóry i stanowi 20% wszystkich nowotworów skóry niebędących czerniakami. Charakteryzuje się on powolnym wzrostem i zdolnością do tworzenia przerzutów, a późno zdiagnozowany może prowadzić do degradacji otaczających go komórek. Powoduje przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych ale też narządów odległych. Stąd diagnostyka jego jest trudna a najskuteczniejszym leczeniem jest wczesne chirurgiczne usunięcie ogniska. Inną metodą jest leczenie miejscowe *via* kombinacja radioterapia/chemoterapia. W ostatnim czasie, w literaturze fachowej, pojawiło się wiele prac poświęconych zastosowaniu różnego rodzaju preparatów pochodzenia naturalnego. Substancje biologicznie aktywne pozyskiwane z materiału roślinnego lub/i zwierzęcego izolowane/ekstrahowane są klasycznymi metodami fizycznymi, chemicznymi czy fizykochemicznymi. W praktyce coraz częściej stosowane są też metody biologiczne (enzymatyczne) jak również kombinacje wspomnianych technik. Wśród całej gamy substancji biologicznie aktywnych, pochodzenia roślinnego, dominują indywidua mające swój udział w mechanizmach związanych z procesami tzw. stresu oksydacyjnego (tj: flawonoidy, alkaloidy,

katechiny, polifenole, taksony i inne). Do grupy związków pochodzenie zwierzęcego, które wykazują właściwości przeciwnowotworowe należą m. in. białka z grupy keratyn będące komponentami cytoszkieletu keratynocytów. Białka te najczęściej pozyskiwane są z wełny, włosów, kopyt czy piór. Hydrolizaty te służą do przygotowania preparatów stosowanych w procesie terapeutycznym.

Zagadnieniom tym poświęcona jest niniejsza praca, w której Autorka skupiła się nad zbadaniem i wykazaniem właśnie terapeutycznych właściwości hydrolizatów pozyskanych z wełny alpaki poprzez ich fizykochemiczną i biologiczną charakterystykę i przeciwnowotworowe działanie na komórki raka kolczystokomórkowego. W oryginalnej koncepcji i konsekwentnej realizacji zamierzonych celów doszukać się można tzw. „nowości naukowej”. Tematyka ma również wymiar aplikacyjny, jako że może stać się podstawą praktycznego wykorzystania i zastosowania w terapii rutynowej.

Przedstawiona do recenzji dysertacja jest typowym dla tego typu opracowaniem zwartym. Znajdzie się tu rozdziały tj.: *Wstęp*, które wprowadzają czytelnika w zagadnienia opisane w ocenianej rozprawie. Dalej to *Część teoretyczna*, stanowiąca przegląd piśmiennictwa i dotychczasowe osiągnięcia w tym zakresie. Kolejny rozdział to *Część doświadczalna*, w którym Doktorantka umieściła podrozdziały: *Założenia i Cel pracy*, *Materiały i metody* zastosowane do realizacji wytyczonych celów i harmonogramu zadań, dalej *Wyniki* i ich *Dyskusja*, a całość kończy *Podsumowanie* i *Wnioski* no i oczywiście *Literatura*. By opracowanie było kompletne i przejrzyste Autorka wyposażyła je w *Wykaz Skrótów* i *Abstrakt* w języku angielskim.

Oceniane opracowanie liczy 97 stron maszynopisu, dość bogato dokumentowanego rysunkami, fotografiami i schematami (38) oraz trzema tabelami i 155 pozycjami przypisów literaturowych. Należy podkreślić, że cytowane prace w większości przypadków datowane są, na ostatnie piętnastolecie!!! Ze względu na układ opracowanie podoba mi się. Tekst napisany jest jasnym i poprawnym językiem i czyta się go bardzo dobrze. Oczywiście, jak w każdej recenzowanej pracy doszukać się można różnych uchybień i niejasności. Zadaniem recenzenta jest wyłowić je, poddać krytycznej ocenie i dyskusji. Wywiązując się z tego obowiązku stwierdzam, iż w tekście znalazłem parę „lapsusów” nomenklaturowych i posługiwanie się językiem żargonowym. Podobnie w wielu przypadkach stwierdzam omyłkowe zamieszczenie lub brak przypisów literaturowych. Szczególnie to razi w kontekście ważnych dla rozprawy prac prof. A. W. Lipkowskiego. Da

się to jednak wybaczyć, choć trzeba je wyartykułować by je eliminować, zwłaszcza w języku i tekście o charakterze naukowym.

Część teoretyczna, to przegląd piśmiennictwa, gdzie Doktorantka w zwięzły sposób przedstawiła istotne informacje dotyczące etiopatogenezy skórnych zmian nowotworowych. To ciekawe i bardzo merytoryczne przedstawienie tego ważnego tematu. Recenzent w znaczący sposób powiększył swoją wiedzę, dzięki czemu wprowadzony został w te niełatwe, interdyscyplinarne zagadnienia. Uzupełnieniem tego jest bardzo obrazowo przedstawiony opis przemian przebiegających na poziomie komórkowym. Kolejnym ciekawym rozdziałem jest część poświęcona aktualnym metodom terapeutycznym. W tej części czytelnik znajdzie odnośniki do metod chirurgicznych, radiologicznych jak i farmakologicznych. To krótkie, aczkolwiek ciekawe przedstawione kompendium wiedzy. Szkoda, że w rozdziale poświęconym preparatom roślinnym nie zwróciła Pani uwagi na prace grupy prof. Placka i wykorzystanie cyklitoli jako surowca do formułacji interesujących preparatów terapeutycznych. Należy Doktorantkę pochwalić za krótki opis i charakterystykę keratyny. Szkoda jednak że w tym rozdziale, zresztą jak w całej rozprawie, unika Pani chemii. Dobrze byłoby przedstawić jakąś strukturę tego ważnego i interesującego białka. Schemat zamieszczony na Ryc. 13 (str. 40) to zbyt mało. Niestety brakuje tu odniesienia do, wg mnie ważnych, pionierskich prac prof. T. Wolskiego z Lublina czy prof. H. Góreckiego z Wrocławia. Największe moje zastrzeżenie odnosi się do opisu hydrolizatów, a w zasadzie braku informacji o metodyce opracowanej i opatentowanej przez prof. A. W. Lipkowskiego. Myślę, że na tym etapie studiów i realizacji badań krótki akapit z danymi opisującymi chemizm i mechanizm procesu winien być zamieszczony. Ta uwaga odnosi się też do rozdziału *Założenia i Cel pracy*. Nie najlepiej to świadczy o staranności przeprowadzonego przeglądu literatury i precyzji sformułowanych tez.

W *części doświadczalnej* Doktorantka starała się opisać metodyki i warunki przeprowadzonych operacji jednostkowych, zastosowane techniki pomiarowe oraz wykaz materiałów i odczynników zastosowanych w badaniach. Wprawdzie w rozdziale tym zamieszczony jest opis hydrolizy i hydrolizaty zastosowane do badań, ale są one oszczędne w treści. Schemat z Ryc. 14 to zbyt mało. Tym bardziej, że w rozdz. 4.2 pisze Pani o badaniu i charakterystyce białek, a właśnie tą fizykochemiczną charakterystykę traktuje Pani po macoszemu. Szkoda. Podobnie jest z danymi przedstawionymi na Ryc. 17, 18 i 19. Co jest co?, i co można przypisać poszczególnym sygnałom? Brak komentarza.

Za najważniejsze dokonania Doktorantki należy uznać:

1. Zaproponowanie oryginalnej idei i przeprowadzenie badań pilotażowych z zastosowaniem hydrolizatów białek i peptydów uzyskanych z wełny alpaki w terapii raka kolczystokomórkowego i badań porównawczych na prawidłowych keratynocytach.
2. Stwierdzenie w wyniku systematycznych badań, że zastosowane i opracowane kompozyty na bazie hydrolizatów z wełny alpaki wykazują antybakteryjne właściwości zarówno w stosunku do patogenów Gram-ujemnych jak i Gram-dodatnich, przy czym większą skuteczność wykazują w stosunku do bakterii Gram-ujemnych (*Esichichia coli*).
3. Zaobserwowanie i postawienie hipotezy, że komórki po inkubacji z wyizolowanymi hydrolizatami z wełny alpaki uległy częściowej lizie przez co obniżeniu uległa żywotność komórek nowotworowych (MR24 o 67%). Dla linii komórkowych SCC-25 i SHEK żywotność ta spada odpowiednio 39 i 56%. Potwierdzeniem tego mogą być dodatkowe sygnały na elektroforegramach oraz niższe wartości potencjałów zeta.
4. Wykazanie, że najniższą aktywność biologiczną wykazują hydrolizaty o symbolu MR2, zaś hydrolizaty MR3 i MR4 wykazały największe zahamowanie migracji komórek w stosunku do linii keratynocytów SCC-25. Hydrolizat MR1 o stężeniu 0,001 % po 72 godz. inkubacji nie wykazał znaczącej aktywności.
5. Zastosowanie 5-fluorouracylu w relacji z hydrolizatami z wełny alpaki powodujące obniżenie żywotności komórek nowotworowych linii SCC-25 w stosunku do linii 5-FU, zaś dodatek 1 μ M diklofenaku skutkowało obniżeniem żywotności komórek raka kolczystkomórkowego.


W tym miejscu należy stwierdzić, że w znaczącym stopniu założone cele i zamierzenia wyznaczone przez Panie Promotor i Doktorantkę *zostały osiągnięte*. W związku z tym mam kilka pytań i uwag dotyczących założeń badawczych, uzyskanych wyników i danych eksperymentalnych:

1. Jakie były kryteria wyboru keratyny pozyskanej z wełny z alpaki? Nigdzie bowiem w ocenianym opracowaniu nie znalazłem argumentów wskazujących na zasadność takiego wyboru, poza przypisem literaturowym. Są przecież inne źródła pozyskiwania keratyny (np. pióra, włosy, wełna owcza, ect) o czym pisze Pani sama. Szkoda, że w ramach badań nie dokonała Pani takiego porównania. Proszę o komentarz w tej kwestii.
2. Jaka była struktura zastosowanej w badaniach keratyny? Wprawdzie wspomina Pani o istnieniu obu struktur (str. 40, Rys. 13) ale nie komentuje czy rozważa ich Pani. Stwierdza Pani autorytatywnie, że struktura α - byłaby tą dogodną do tworzenia preparatu/procesu terapeutycznego. Dlaczego? Jakie są przesłanki naukowe. Stwierdzenie, że „*podobny dobrze oddziałuje z podobnym*”, to wprawdzie stara prawda chemiczna, ale to wg mnie zbyt mało jak na interpretację naukową.

3. Co kierowało Panią przy wyborze takich a nie innych hydrolizatów? Podanie składu pierwiastkowego to chyba zbyt mało jak na poważne rozważania naukowe, zwłaszcza chemiczne. Nigdzie nie znalazłem składu aminokwasowego badanych hydrolizatów białkowych. Myślę, że taka informacja bardziej przekonująco odniosła by się do interpretacji wyników i zamieszczonych rozważań. Tym bardziej, że hydrolizaty keratynowe dobrze opisane są w literaturze przez polskich badaczy.
4. Podobnie mało przekonująco brzmi interpretacja dotycząca aktywności i przeżywalności komórek bez użycia cytometrii przepływowej czy cytometrii masowej. To prawda, pewne wnioski można wyciągnąć z pomiaru potencjału zeta, ale są one raczej spekulatywne w stosunku do danych szczegółowych zwłaszcza pomiarów cytometrycznych. Prosiłbym o komentarz w tej kwestii.
5. Pokazuje Pani elektroforegramy, co one w tej postaci wnoszą (Ryc. 24, str. 59)? Który sygnał odpowiada za miarodajny wynik pomiarowy? Elektroforegramy nie są „czyste”. Czy nie lepiej byłoby korelować wartości potencjału zeta a danymi elektromigracyjnymi? Tu zresztą więcej jest uwag odnoszących się do interpretacji.
6. Często używa lub nadużywa Pani pojęć *optymalizacja* czy *optymalny* (np. skład hydrolizatu, czy wyników pomiarowych). Co Pani rozumie pod pojęciem „optymalny”? Czy nie trafniej byłoby użyć określenia *dobór* czy *wybór* w kontekście składu?

Reasumując, powyższe uwagi mają wprawdzie charakter dyskusyjny i nieco obniżają moją pozytywną, merytoryczną ocenę pracy. Spodziewam się, że uzyskam na nie odpowiedź podczas publicznej obrony. Jednocześnie uważam, że w świetle obowiązującego prawa (Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*, a w szczególności artykuły i przepisy; *O stopniach naukowych i tytule naukowym* wraz z uzupełnieniami) przedstawiona rozprawa spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i **wnoszę** do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie o **dopuszczenie** Pani **lek. Tetsiany Damps** do dalszych etapów postępowania celem uzyskania stopnia **doktora nauk** w dyscyplinie **nauk medycznych**, w dziedzinie **nauk medycznych i nauk o zdrowiu**.

Stary Toruń / Toruń, 25 sierpień 2022 r


prof. zw. dr hab. Bogusław Buszewski, dr h.c. muir