

Prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka

Lublin, dnia 31 sierpnia 2018 r.

Kierownik Katedry i Zakładu Toksykologii

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b

Tel. +48 81 4487402

e-mail: jaroslaw.dudka@umlub.pl

RECENZJA

Pracy doktorskiej mgr Magdaleny Marty Surdyki pt. Mitochondrialna i jądrowa genomika w nowotworach sutka psów (*Canis lupus familiaris*) wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Brygidy Ślaskiej i promotora pomocniczego dr inż. Artura Gurgula

Podstawę pracy doktorskiej mgr Magdaleny Surdyki stanowią trzy publikacje o łącznym IF 5,379 i łącznej liczbie punktów MNiSW równej 110. Dwie prace zostały opublikowane w czasopiśmie cieszącym się znacznym międzynarodowym prestiżem - *Veterinary and Comparative Oncology* (IF=2,270), jedna publikacja w czasopiśmie *Polish Journal of Veterinary Sciences* (IF=0,839). Warte podkreślenia jest fakt, że we wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a procentowy udział w pracach zawiera się w przedziale 55-80%. We wszystkich publikacjach posiada dominujący wkład w tworzenie koncepcji prac, opracowanie założeń metodycznych, realizację badań laboratoryjnych, gromadzenie danych, analizę i opracowanie wyników, formułowanie wniosków, redagowanie manuskryptu, czy korektę manuskryptu. Deklaracje Autorki, co do procentowego udziału w publikacjach znajdują potwierdzenie w oświadczeniach współautorów zamieszczonych na str. 27 pracy doktorskiej. W przesłanych materiałach znajduje się oświadczenie Promotora o spełnieniu warunków pracy do przedstawienia w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego, oświadczenie Autorki o samodzielnym napisaniu pracy oraz braku przeszkód prawnych w dalszym procedowaniu na stopień doktora. Opracowanie, oprócz wykazu przedmiotowych publikacji oraz pełnych tekstów samych publikacji zwiera standardowy układ rozdziałów dla prac naukowych poczynając od Wstępu, Celu pracy, rozdziału Materiały i Metody do rozdziału Omówienie wyników, który Autorka podzieliła na opis analizy genomu

mitochondrialnego, analizę genomu jądrowego oraz analizę asocjacji. Opis merytoryczny kończy rozdział Podsumowanie i wnioski. Praca zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim. Praca doktorska stanowi spójny tematycznie zbiór trzech prac oryginalnych ujętych w tytule „Mitochondrialna i jądrowa genomika w nowotworach sutka psów (*Canis lupus familiaris*)”. Powyższe upoważnia do stwierdzenia, że praca doktorska spełnia wszystkie wymagania formalne.

Ocena merytoryczna

Choroby nowotworowe stanowią niezmiennie od wielu lat główną przyczynę zgonów zarówno w populacji światowej jak i polskiej. Według *American Cancer Society* rak piersi globalnie stanowi 25% wszystkich nowotworów na które zapadają kobiety, a w 2012 r. zarejestrowano 1,7 miliona nowych przypadków. Guzy gruczołu sutkowego są drugim pod względem częstości występowania nowotworem psów i najczęściej występującym nowotworem wśród suk, stanowiąc 52% wszystkich diagnozowanych u nich guzów. Ponadto w ponad 80% przypadków nowotwory sutka są zmianami złośliwymi. W poznaniu znaczenia zmian molekularnych i genetycznych w rozwoju raka piersi u kobiet dokonał się olbrzymi postęp, natomiast wiedza w tym zakresie u psów jest bardzo ograniczona.

Od dawna znana jest zmiana fenotypu metabolicznego w komórkach nowotworowych polegająca na aktywowaniu glikolizy, niezależnie od środowiska normoksji, czy hipoksji – odpowiednio efekt Warburga oraz efekt Pasteura, co zostało wykorzystane z powodzeniem w diagnostyce nowotworowej w Pozytonowej Emisyjnej Tomografii (PET). Niewyjaśniona jest jednak przyczyna efektu Warburga – nie wiadomo bowiem, czy aktywacja glikolizy jest procesem dodatkowym (pozamitochondrialnym), czy procesem adaptacyjnym, aktywowanym ze względu na pojawiającą się niewydolność mitochondriów. Poznanie zaburzeń mitochondrialnych na podłożu genetycznym, o czym traktuje praca mgr Magdaleny Surdyki, może odegrać istotną rolę w rozumieniu mechanizmu powstawania zmian szlaków pozyskiwania ATP, a w połączeniu z analizą korelacji może przyczynić się do znacznej poprawy prewencji i leczenia raka sutka u psów a w kolejnej perspektywie u ludzi. Z tego względu wybór tematyki badań należy uznać za uzasadniony, a sam temat ważny i aktualny.

We wstępie Autorka w zwięzły, logiczny sposób przybliży czytelnika do celu pracy. Przytacza dane epidemiologiczne świadczące o dużej częstości występowania raka sutka u suk, zależność występowania tego nowotworu od ich wielkości i wieku, przytacza aktualną

klasyfikację histologiczną WHO raka gruczołu sutkowego psa; poprawnie interpretuje możliwość zależności rozwoju raka sutka od uwarunkowań genetycznych na podstawie skłonności rasowej. Autorka we wstępie wskazuje na konieczność poszukiwania nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych w celu uzyskania znacznej poprawy w leczeniu psów z tym nowotworem. W ten sposób wytycza kierunek swoich badań ujętych w trzech opublikowanych artykułach. Uzasadnienie sposobu realizacji postawionego celu badawczego oparte jest na analizie zmian w DNA jądrowym i mitochondrialnym opisanych w literaturze przedmiotu w raku piersi u kobiet, w tym w niekodujący hiperzmiennym regionie, czyli pętli D, szczególnie narażonej na powstawanie mutacji, genach kodujących białka, zwłaszcza w genie kodującym 2. podjednostkę dehydrogenazy NADH, genie kodującym 2. i 3. podjednostkę oksydazy cytochromu c oraz genie kodującym 6. podjednostkę syntazy ATP. Dalej można zaobserwować pewną niekonsekwencję w stwierdzeniu, iż (w domyśle) uszkodzenia w powyższych genach, odpowiadające za metabolizm tlenowy komórki bez wątplenia mają związek z jej przekształceniem w komórkę nowotworową (str. 8) – dalej, w tym samym akapicie Autorka poprawnie stwierdza, że „Nadal bez odpowiedzi pozostaje pytanie, czy zmiany zaistniałe w sekwencji mtDNA są przyczyną, czy skutkiem transformacji nowotworowej” W ostatniej części wstępu Doktorantka charakteryzuje szczegółowo podłoże genetyczne nowotworów sutka psów, wykazuje braki w istniejącym stanie wiedzy i deklaruje podjęcie próby poszukiwania związku nowotworów sutka u psów z zaburzeniami strukturalnymi w genomie mitochondrialnym i jądrowym.

W mojej ocenie Doktorantka bardziej precyzyjnie zdefiniowała cel swoich badań w ostatnim zdaniu „Wstępu” niż w pierwszym zdaniu rozdziału zatytułowanego „Cel pracy”, które brzmi: „Celem pracy było określenie defektu genomu mitochondrialnego i jądrowego w nowotworach sutka psów z wykorzystaniem technik z zakresu genomiki.” Wykazanie takich zmian jest jedynie pierwszym krokiem w poszukiwaniu powiązań procesu transformacji nowotworowej z czynnikami o potencjalnym znaczeniu prognostycznym, co *nota bene* Autorka zrealizowała w swoich badaniach. Jednak samo określenie defektów nie może być celem samym w sobie. W tym kontekście tytuł pracy jest dość ogólny, ale poprawny.

Rozdział „Materiał i metodyka” badań jest opisany na trzech stronach pracy doktorskiej w sposób jasny i wystarczający do powtórzenia analiz w innym laboratorium. Szczegóły znajdują się ponadto w załączonych artykułach. Wartościowym aspektem pracy jest oznaczanie mtDNA zarówno w tkankach nowotworowych, marginesie tkanki zdrowej oraz

krwi, co świadczy o rzetelnym planowaniu badań, tak, aby uzyskać jak największe rozeznanie w przyczynach rozwoju guza, mimo znacznego zwiększenia kosztów i pracy. Do badań wykorzystano nowoczesne techniki analiz, w tym PCR, wysokowydajnych mikromacierzy, pozwalających na oznaczanie SNP, szacowanie prawdopodobieństwa efektu funkcjonalnego białka spowodowane substytucją aminokwasową, przewidywanie struktury drugorzędowej sekwencji białkowych, przewidywanie helis transmembranowych, a ponadto wykonano badania oceny złośliwości histologicznej. Umiejętność tak zaawansowanych technik badawczych świadczy o bardzo dobrym opanowaniu nowoczesnego warsztatu naukowego.

Wyniki i omówienie badań przedstawione na 9 stronach stanowią syntetyczne ujęcie badań opublikowanych w trzech artykułach. Biorąc pod uwagę, iż są to badania pionierskie trudno o odniesienie otrzymanych rezultatów do literatury światowej. Z tego zapewne powodu Autorka w tytule rozdziału unika określenia „dyskusja”. Wyniki badań genomu mitochondrialnego wskazują między innymi na obecność licznych polimorfizmów i kilku mutacji w pętli D i czterech fragmentach genów ND2, COX2, ATP6, COX3, co świadczy, o tym, że z powodzeniem wytypowano geny do przeprowadzenia badań. Mutacje w genomie mitochondrialnym zostały przedstawione w tabeli. Wynika z nich między innymi, że sekwencja w tkance zdrowej i sekwencja w tkance z guzem jest taka sama, ale inna niż we krwi. Jest to interesujące i warte komentarza lub wniosku. Analiza genomu jądrowego wykazała zmiany liczby kopii, utratę heterozygotyczności oraz dominację amplifikacji nad delecjami. W kontekście prowadzonych badań wydaje się uzasadnione, aby w omówieniu wyników odnieść się do oceny przewidywania wystąpienia zburzeń mitochondrialnych na podstawie defektów w DNA jądrowym kodującym białka mitochondrialne. W ostatniej części rozdziału Doktorantka przeprowadziła analizę asocjacji wybranych fragmentów genomu mitochondrialnego oraz zmian liczby kopii i utraty heterozygotyczności w genomie jądrowym ze stopniem złośliwości nowotworu, rozmiarem ciała i wiekiem psów. Ważną konkluzją tych analiz było stwierdzenie, że zburzenia strukturalne DNA mogą być wskaźnikiem prognostycznym nowotworów sutka psów.

Wnioski są napisane bardzo precyzyjnie z dużą ostrożnością, oddają jednak całkowicie istotę uzyskanych wyników i celu badań. Równocześnie świadczą o umiejętności syntetycznego myślenia, a tym samym dojrzałości naukowej Doktorantki.

W pracy doktorskiej Autorka przytoczyła 39 właściwie dobranych pozycji literaturowych, z czego znaczna liczba pochodzi z ostatnich 10 lat.

Podsumowanie

W przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej, opartej na trzech wartościowych publikacjach, Autorka w jasny logiczny sposób przedstawiła uzasadnienie podjęcia badań, które wnoszą znaczący wkład do światowej wiedzy w zakresie przedmiotu. Badania zaplanowano merytorycznie poprawnie, ponadto wymagały one bardzo dużego nakładu pracy i wiedzy eksperckiej. Autorka w swoim opisie unika żargonu naukowego, język jest precyzyjny co świadczy o profesjonalności. Opis uzyskanych wyników, zwłaszcza wnioski świadczą o zdolności ujęcia w sposób syntetyczny obszernego zakresu badań. Jednocześnie są napisane w sposób bardzo ostrożny, co jest cechą dużej dojrzałości naukowej. W zredagowanej pracy jak i opublikowanych artykułach trudno doszukać się błędów lub słabych stron wartych podkreślenia. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego nie tylko o dużej wartości poznawczej ale również aplikacyjnej.

Biorąc powyższe pod uwagę, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr Magdaleny Surdyki pt. Mitochondrialna i jądrowa genomika w nowotworach sutka psów (*Canis lupus familiaris*) odpowiada wymogom stawianym przez art. 13 ust. 1 ustawy 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 tego względu przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr Magdaleny Surdyki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie mając na uwadze dużą rangę i aktualność podjętego problemu badawczego, doskonale opanowanie przez Doktorantkę nowoczesnych i wysoce specjalistycznych technik analitycznych, a także duże znaczenie aplikacyjne opracowanych metod badawczych, niniejszym przedkładam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Surdyki.



Prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka