

Kraków, 5 września 2022 r.

Dziekan
Wydziału Nauk o Zdrowiu
prof. dr hab. Alina Borkowska

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Kaźmierskiego pt.: „Toksyčność leków przeciwnowotworowych na komórki macierzyste płynu owodniowego”

wykonanej w Zakładzie Inżynierii Tkankowej Katedry Urologii i Andrologii Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Podstawa formalną wykonania recenzji stanowi uchwała Rady Dyscypliny Nauki o Zdrowiu Collegium Medicum w Bydgoszczy nr 96/2022 z dnia 9 czerwca 2022 roku i pismo prof. dr hab. Aliny Borkowskiej – Dziekana Wydziału Nauk o Zdrowiu (PADN. 5201.51.2019).

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Łukasza Kaźmierskiego dotyczy zagadnienia toksycznego wpływu najczęściej stosowanych chemioterapeutyków stosowanych w leczeniu chorych na nowotwory złośliwe na płód. Obecnie u kobiet w ciąży odnotowuje się zwiększone ryzyko zachorowania na choroby nowotworowe, co wiąże się ze wzrostem średniego wieku kobiet i średniego wieku pierwszej ciąży. Do najczęściej występujących nowotworów złośliwych u ciężarnych, podobnie jak u innych kobiet, zalicza się raka piersi, płuca oraz szyjki macicy. Stosunkowo często dochodzi także do rozwoju białaczek i chłoniaków. W wielu tego typu przypadkach terapia przeciwnowotworowa jest często odraczana do okresu po porodzie ze względu na ryzyko uszkodzenia płodu. Odroczenie to może jednak mieć znaczący wpływ na pogorszenie rokowania chorej. Stąd też zbadanie wpływu stosowanych chemioterapeutyków na rozwijający się płód jest obecnie niezwykle istotnym zagadnieniem badawczym. Z tematyką tą związana jest rozprawa doktorska mgr Łukasza Kaźmierskiego, której cel Doktorant sformułował jako „kompleksową ewaluację cytotoksycznego wpływu obecnie stosowanych leków przeciwnowotworowych na komórki macierzyste płynu owodniowego.” Uważam zatem, że podjęta tematyka badawcza i wyznaczone cele są bardzo ambitne i istotne z powodu ich potencjału aplikacyjnego.

Narodowy Instytut Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie
- Państwowy Instytut Badawczy
Oddział w Krakowie
ul. Garncarska 11
31-115 Kraków

Dyrekcja
Tel.: +48 12 634 82 00
Fax: +48 12 422 66 80
dyrektor@onkologia.krakow.pl
www.onkologia.krakow.pl

Centrala
Tel.: +48 12 634 80 00
Fax: +48 12 423 10 76
NIP: 5250008057
REGON: 000288366-0035

Wielka szkoda jednak, że formułując cel swojej rozprawy Doktorant nie podkreślił jej aplikacyjnego charakteru. Możliwość wyróżnienia chemioterapeutyków o bardziej i mniej cytotoksycznym działaniu na komórki macierzyste płynu owodniowego może bowiem doprowadzić do próby opracowania nowych strategii leczenia ciężarnych z określonymi typami nowotworów złośliwych. Autor powinien również wyjaśnić co oznacza „kompleksowa charakterystyka” badanych komórek.

Na szczególne uznanie zasługuje moim zdaniem model komórek wybrany przez mgr Kaźmierskiego do badania wpływu stosowanych chemioterapeutyków na rozwijający się płód, jakim są komórki macierzyste płynu owodniowego (AFSCs). Dużą zaletą tych komórek jest możliwość jednoczesnego pobrania próbki płynu owodniowego zarówno na potrzeby badań prenatalnych, jak i w celu izolacji tych komórek. Warto także podkreślić, że obecnie nie ma dostępnych wyników badań dotyczących działania wybranej przez Doktoranta grupy chemioterapeutyków na komórki macierzyste płynu owodniowego.

1. Formalna ocena układu rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Łukasza Kaźmierskiego liczy 146 stron tekstu, podzielonego na klasyczne w tego typu dokumencie rozdziały, a mianowicie: wstęp, cel pracy, opis metodyki badawczej, omówienie wyników, dyskusja, podsumowanie, wnioski oraz wykaz wybranych pozycji piśmiennictwa. W skład pracy wchodzi 8 tabel i 65 rycin. W swojej rozprawie Autor zamieścił również streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów oraz spis tabel i rycin. Należy dodać, że na badania, których wyniki zostały zaprezentowane w recenzowanej pracy, uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernia w Toruniu, Collegium Medium w Bydgoszczy z dnia 23 marca 2021 roku, którą załączono do doktoratu wraz z odpowiednimi aneksami.

Podsumowując formalną ocenę pracy doktorskiej mgr Kaźmierskiego stwierdzam, że praca ta została przygotowana zgodnie z normami przyjętymi dla tego typu opracowań.

2. Merytoryczna ocena pracy

Pierwszą część pracy stanowi 10-stronicowy wstęp teoretyczny, w którym Autor pokrótce wprowadza czytelnika w zagadnienie występowania nowotworów złośliwych u kobiet w ciąży, omawia także metody leczenia chemicznego ciężarnych, u których

stwierdzono różnego typu nowotwory złośliwe, a także przedstawia budowę chemiczną, jak i mechanizmy cytotoksycznego działania poszczególnych chemioterapeutyków. Ostatnim zagadnieniem opisanym w tej części rozprawy jest charakterystyka komórek macierzystych płynu owodniowego. W tej części rozprawy Doktorant stwierdził, że „liczebność obecnych w płynie owodniowych komórek ma charakter zmienny i jest uwarunkowany od trymestru ciąży”. W związku z tym stwierdzeniem i biorąc pod uwagę, że Autor w swojej rozprawie skonstatował również, że jedną z zalet komórek płynu owodniowego jest możliwość ich pozyskania podczas amniopunkcji wykonywanej na potrzeby badań prenatalnych, proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do tego zagadnienia w czasie obrony rozprawy doktorskiej, zwłaszcza w kontekście optymalnego czasu pozyskiwania komórek płynu owodniowego w trakcie ciąży.

W rozdziale „Materiał, metody” Autor przedstawił szczegółowy opis zastosowanych technik doświadczalnych i metodyki przeprowadzonych eksperymentów. Na uwagę zasługuje szeroki panel metod użytych do badań na poziomie komórkowym (hodowle komórkowe 2D i 3D, testy proliferacji, aktywności metabolicznej, starzenia się komórek, oraz poziomu apoptozy, cytofluorymetryczna analiza markerów powierzchniowych rozkładu komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, analiza zmian morfologicznych i cytoszkieletu). Użycie tak urozmaicanych, lecz wzajemnie komplementarnych metod bardzo dobrze świadczy o warsztacie badawczym Doktoranta. Przedstawiony przez Doktoranta opis metod badawczych jest jasny i dokładny. Na uznanie zasługuje także fakt, że mgr Kaźmierski, celem badania kinetyki wzrostu komórek w oparciu o analizę obrazową z użyciem klasyfikatora pikseli opartego o dedykowaną sieć neuronową, samodzielnie przeprowadził trenowanie i walidację sieci neuronowej. W rozdziale tym zabrakło mi jednak informacji dotyczących procedury pobierania płynu owodniowego, zwłaszcza o etapie ciąży, w którym płyn owodniowy był pobierany, jego pozyskanej objętości, czy też objętości przeznaczonej do izolacji AFSCs. Proszę o doprecyzowanie tych informacji w trakcie obrony rozprawy doktorskiej. Szkoda też, że Doktorant w rozdziale „Materiał, metody” nie zamieścił podrozdziału dotyczącego metod analiz statystycznej. Należy przyznać, że informacje o zastosowanych testach statystycznych można odnaleźć w rozdziale „Wyniki”, jednak zestawienie ich razem, jak również uzasadnienie wyboru poszczególnym testów, niewątpliwie ułatwiłoby czytelnikowi pracy zapoznanie się z warsztatem Doktoranta dotyczącym analizy statystycznej.

W pierwszych podrozdziałach opisujących wyniki mgr Kaźmierski koncentruje się na wynikach dotyczących ekspresji powierzchniowych markerów AFSCs oraz ich potencjału do różnicowania. Analizy te pozwoliły na potwierdzenie mezenchymalnego charakteru badanych komórek oraz ich różnicowanie się w kierunku adipocytów i osteocytów. Pragnę jednak zwrócić uwagę, że Doktorat powinien zacząć omawianie wyników od przedstawienia cech epidemiologiczno-klinicznych grupy 350 kobiet, od których pobrano płyn owodniowy, podając wiek, okres ciąży, w którym pobrano materiał do dalszych badań, powód pobrania płynu owodniowego, odsetek sukcesu, rozumiany jako uzyskanie stabilnej hodowli AFSCs. W dalszych podrozdziałach dotyczących opisu wyników Autor przedstawia analizę aktywności metabolicznej badanych komórek, badanej testem MMT. w zależności od wybranych stężeń wybranych chemioterapeutyków i różnych czasów inkubacji. Na podstawie wyników testu MMT Doktorant wyznaczył wartości parametru IC50 (IC – ang. *inhibiting concentration*) dla badanych leków. Parametr ten oznacza najniższe stężenie, przy którym proliferacja/żywołność komórek zostaje zahamowana w 50%, w odniesieniu do kontroli. Dla wszystkich badanych punktów czasowych, podczas gdy dla karboplatyny i 5-fluorouracylu były one co najmniej o rząd wielkości większe. Proszę jednak w wyjaśnienie czy opisywane różnice w wartości IC50 dla poszczególnych chemioterapeutyków były statystycznie istotne.

Cześć prezentowanych wyników dotyczy analizy tempa proliferacji, stopnia starzenia, poziomu apoptozy, kinetyki wzrostu badanych komórek i oraz zmian morfologicznych w cytoszkielecie analizowanych komórek w zależności od stężenia badanych cytostatyków i czasu inkubacji. Przeprowadzane badania ujawniły istotny spadek poziomu proliferacji dla wszystkich badanych stężeń karboplatyny, winblastyny i doksorubicyny i czasów ich inkubacji w odniesieniu do komórek nieeksponowanych. Znaczących różnic w stosunku kontroli nie odnotowano natomiast w przypadku 24-godzinnej ekspozycji na badane stężenia 5-fluorouracylu i 24-godzinnej inkubacji z cisplatyną w stężeniu 0,1 μM . Podobne wyniki otrzymano w przypadku analiz liczby komórek w fazie G1 i G2 cyklu komórkowego oraz poziomu apoptozy. Odnotowano mianowicie istotne zmiany liczby komórek w fazach G1 i G2 oraz wzrost poziomu komórek apoptotycznych dla wszystkich analizowanych stężeń winblastyny i doksorubicyny i czasów inkubacji z tymi lekami. Odmienne, analiza zmian morfologicznych szkieletu f-aktynowego oraz wimentynowego ujawniła istotne zmiany w morfologii cytoszkieletu w przypadku 72-godzinnej inkubacji ze wszystkimi analizowanymi chemioterapeutykami, choć najniższe stężenia, przy których obserwowano te zmiany

odnotowano ponownie dla winblastyny i doksorubicyny. Bardzo ciekawe wyniki dotyczą oceny kinetyki wzrostu badanych komórek przeprowadzonej w zależności od stopnia starzenia się komórek. W komórkach senescentnych Autor stwierdził brak znaczącego wpływu badanych leków w mniejszych stężeniach na kinetykę wzrostu analizowanych komórek, za wyjątkiem doksorubicyny. Dla tej antracykliny Doktorant wykazał zahamowanie kinetyki wzrostu dla wszystkich badanych stężeń. Autor stwierdził jedynie „brak widocznego zamierania pod wpływem stężenia 100 μM , co jak podaje jest spowodowane „ograniczeniem technicznym metody”. Bardzo proszę zatem o wyjaśnienie jakie techniczne ograniczenia metody uniemożliwiły analizę wpływu doksorubicyny w stężeniu 100 μM na kinetykę wzrostu badanych komórek. Odmienne wyniki Doktorant odnotował w przypadku analizy komórek niesenescentnych, podczas której stwierdził zahamowanie kinetyki wzrostu dla większych stężeń wszystkich badanych cytostatyków. Podsumowując uzyskane wyniki, mgr Kaźmierski stwierdza, że przeprowadzone analizy wykazały cytotoksyczny wpływ wszystkich leków na AFSCs, który był zależny od zastosowanego stężenia chemioterapeutyku i czasu inkubacji. Jedynie cisplatyna w stężeniu 0,1 mikromola i karboplatyna oraz 5-fluorouracyl w stężeniu 1 mikromola wykazywały się mniejszą cytotoksycznością. Doktorant słusznie podkreśla jednak, z godną uznania ostrożnością, że w świetle uzyskanych wyników trudno jest jednak wysnuć hipotezę o uznaniu wyżej wymienionych stężeń za bezpieczne dla płodu, zwłaszcza wobec małej liczby danych na temat przenikania badanych leków z krwioobiegu ciężarnej do płodu. Innym istotnym klinicznie spostrzeżeniem jest zaobserwowany mniejszy poziom cytotoxycznosci na AFSCs, charakteryzujących się bardziej zaawansowanym procesem starzenia biologicznego, co jak celnie zauważa Doktorant, może sugerować potencjalnie bezpieczniejsze zastosowanie chemioterapii na późniejszych etapach ciąży.

Sposób opisu wyników pracy świadczy o bardzo dobrej orientacji Autora w zagadnieniach będących jej przedmiotem. O dojrzałości naukowej Doktoranta dowodzi ponadto wnikliwa i krytyczna analiza otrzymanych wyników, zaprezentowana w rozdziale Dyskusja. Zabrakło mi w niej jednak przeanalizowania aplikacyjnego potencjału otrzymanych wyników, jak również wytyczenia dalszych planów badawczych.

Przedstawione wnioski są uzasadnione w świetle uzyskanych wyników. Nasuwa się jednak w tym miejscu pytanie o biologiczny sens poczynionych obserwacji sugerujących bardziej cytotoksyczne działanie winblastyny i doksorubicyny na AFSCs w porównaniu do innych badanych leków.

W swojej pracy Doktorant zacytował 144 pozycje piśmiennictwa, z których część została opublikowana w 2021 i 2022 roku. Świadczy to o bardzo dobrej orientacji Doktoranta w temacie pracy. Pragnę jednak zwrócić uwagę na liczne błędy popełnione w rozdziale Dyskusja, które dotyczą cytowania poszczególnych pozycji bibliografii. Często bowiem numer danej pozycji w bibliografii nie odpowiada konkretnej publikacji, na którą powołuje się Doktorant w dyskusji. Występują także liczne pomyłki dotyczące nazwisk poszczególnych autorów.

Słabością pracy są również liczne usterki edytorskie, takie jak błędy stylistyczne i literowe. Zauważyłam też pewne niezręczności językowe (np. „macierzystość komórek”, „nowotwory głowy i szyi”) i brak wyjaśnienia niektórych skrótów (np. IC50, CI) w „Wykazie stosowanych skrótów”.

3. Podsumowanie

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr Łukasza Kaźmierskiego jest spójnym tematycznie dziełem i stanowi istotny wkład w rozwój wiedzy na temat oddziaływania powszechnie stosowanych chemioterapeutyków na komórki ludzkiego płodu. Realizując ocenianą pracę, Doktorant dowiódł znajomości metodologii pracy naukowej, a przedstawione wyżej uwagi krytyczne nie umniejszają wartości przedstawionej dysertacji. Stwierdzam zatem, że przedstawiona rozprawa spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim w ustawie o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003), a co za tym idzie zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki o Zdrowiu Collegium Medicum w Bydgoszczy o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Kaźmierskiego i dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n .med. Beata Biesaga, prof. NIO-PIB Oddział w Krakowie

