



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Immunologii
Centrum Biostruktury

ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa
tel.: 0-22-599-21-99, fax: 0-22-599-21-94
e-mail: immunologia@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl/immunologia

Warszawa, 31 sierpnia 2013 r.

Szanowny Pan

Prof. dr hab. Wojciech Francisz

Dziekan Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ

Szanowna Pani

prof. dr hab. Marta Dziedzicka-Wasylewska

Prodziekan Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ ds. dydaktyki

OCENA

ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK BIOLOGICZNYCH

MGR MARTYNY KRZYKAWSKIEJ - SERDA

ZATYTUŁOWANEJ: "PRZECIWNOWOTWOROWA TERAPIA FOTODYNAMICZNA Z
ZASTOSOWANIEM POCHODNEJ BAKTERIOCHLORYNY – WYBRANE EFEKTY
KOMÓRKOWE, NACZYNIOWE I IMMUNOLOGICZNE"

Terapia fotodynamiczna (ang. PDT – photodynamictherapy) to uznana metoda leczenia wielu chorób człowieka, w tym chorób nowotworowych. Jest to terapia z założenia selektywna wobec zmian nowotworowych dzięki gromadzeniu się fotouczulacza w obrębie guza oraz naswietlaniu światłem widzialnym jedynie zmian chorobowych. W onkologii terapia fotodynamiczna jest z powodzeniem stosowana od ponad 20 lat, głównie do leczenia zmian przednowotworowych oraz nowotworów we wczesnym i późnym (jako terapia paliatywna) stadium rozwoju. Ocena właściwości biologicznych nowego fotouczulacza, pochodnej bakteriochloryny uzyskanej z zaprzyjaźnionego z macierzystą jednostką naukową Doktorantki laboratorium z portugalskiego Uniwersytetu w Coimbrze, stanowiąca tematykę badań przeprowadzonych podczas przygotowania przedstawionej mi do oceny rozprawy pani mgr Martyny Krzykawskiej – Serda, wpisuje się w jeden z popularnych i często eksploatowanych nurtów badań w dziedzinie fotodynamicznej terapii nowotworów.

Praca ma klasyczny układ. We wprowadzeniu Doktorantka poruszyła szereg zagadnień dotyczących charakterystyki nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem fotodynamicznej terapii nowotworów. Jest to obszerna część rozprawy, napisana z dużą uwagą, jednak



zawierająca dość liczne nieścisłości i nadmierne uproszczenia. Dla przykładu: jaki dokładnie wpływ na heterogenność nowotworu ma przełączenie angiogenetyczne (str. 22)? Czym są „zmutowane szlaki sygnalizacyjne” (str. 23)? Na uwagę zasługuje staranny opis fotouczulaczy stosowanych w PDT oraz paragraf dotyczący mechanizmów fotosensybilizacji. Moje wątpliwości budzi wykorzystanie przez Doktorantkę do ilustracji opisywanych zjawisk rycin lub fragmentów rycin opublikowanych przez innych autorów (np. ryc. 2.2, 4.1, 4.2 czy 5.1). Brak jest informacji o uzyskaniu zgody autorów na ich publikację w rozprawie. Ponadto, na tym etapie pracy stwierdzenie, że „terapia fotodynamiczna z wykorzystaniem pochodnej bakteriochloryny jako fotosensybilizatora oraz promieniowania magnetycznego z zakresu bliskiej podczerwieni zdaje się spełniać nadzieje lekarzy i pacjentów” (str. 47) wydaje się być bardzo na wyrost.

Doktorantka sformułowała 7 szczegółowych zadań badawczych mających na celu scharakteryzowanie mechanizmów działania terapii fotodynamicznej z zastosowaniem pochodnej bakteriochloryny w dwóch układach doświadczalnych: PDT wymierzonej w unaczynienie nowotworu oraz PDT skierowanej bezpośrednio na komórki guza. Mam do nich jedną, dość zasadniczą uwagę. Podczas redagowania zadań badawczych niezbyt fortunne jest używanie sformułowań typu „wykazać” czy „dowieść”. Słowa te sugerują, że wynik badań jest już znany lub, że będzie on jednoznacznie pozytywny, a tego przecież eksperymentator nie jest w stanie przewidzieć przed wykonaniem zaplanowanych badań.

Materiały i metody zostały opisane niezwykle starannie i szczegółowo. Jednak Doktorantka powinna zwrócić baczniejszą uwagę na stosowaną terminologię (np. co dokładnie oznacza stwierdzenie, że „nieprzeżywalną metodą oznaczania przeżywalności komórek jest test MTT”?). Z innych drobnych uwag, morfologia jąder komórkowych (rys. 5.3) byłaby dużo łatwiejsza do oceny na zdjęciach spod większego powiększenia z wyraźnym zaznaczeniem, np. strzałką, które jądra komórkowe odpowiadają poszczególnym opisom. Ponadto, zamiast stwierdzenia „poziom cytokin” z pewnością byłoby użyć sformułowanie „stężenie cytokin” i podać nazwę materiału, w którym to stężenie oznaczano. Niemniej, staranność i wysiłek, jaki Doktorantka włożyła w przygotowanie tej części rozprawy bez wątpienia zasługują na podkreślenie i pochwałę.

Najbardziej obszernym rozdziałem pracy jest opis uzyskanych wyników. W rozdziale 1. Doktorantka oceniła widma absorpcji oraz fluorescencji badanego fotouczulacza z wykorzystaniem kilku rozpuszczalników. Przy niezwykle dokładnym opisie tej sekcji wyników zabrakło mi tu jednak zdania komentarza, który rozpuszczalnik dla badanej bakteriochloryny i dlaczego właśnie ten wybrano do dalszych badań. W rozdziale 2. przedstawiono wyniki oceny gromadzenia fotouczulacza in vitro w hodowlach komórkowych oraz in vivo u myszy. Uzyskane wyniki oraz sposób ich prezentacji wskazują na duże doświadczenie Doktorantki w



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Immunologii
Centrum Biostruktury

ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa
tel.: 0-22-599-21-99, fax: 0-22-599-21-94
e-mail: immunologia@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl/immunologia

przeprowadzaniu tego rodzaju doświadczeń. Mam jednak pytanie dotyczące wyboru szczepu myszy po inokulacji właściwych komórek nowotworowych do poszczególnych doświadczeń: czy i jakie argumenty wpłynęły na oznaczenie kinetyki usuwania fotouczulacza u myszy DBA/2 a obrazowanie dystrybucji fotouczulacza w guzie u myszy C57BL/6? Rozdział 3. zawiera wyniki oceny toksyczności badanej pochodnej bakteriochloryny w ciemności. Niektóre wnioski zawarte w tej części rozprawy wydają się być wyciągnięte na wyrost. Skoro wyniki uzyskane po inkubacji komórek B16F10 czy 2H11 z fotouczulaczem nie różnią się istotnie statystycznie od wyników uzyskanych dla odpowiednich komórek kontrolnych, trudno zgodzić się ze stwierdzeniem, że „badana pochodna bakteriochloryny wykazuje skłonność do stymulowania wzrostu (...) komórek” (str. 110). Ponadto, w opisie doświadczeń nad ogólnoustrojową toksycznością badanego związku u myszy brak odniesienia do wyników zamieszczonych w suplemencie pracy. Rozdział 4. zawiera wyniki doświadczeń oceniających działanie terapii fotodynamicznej z zastosowaniem badanej pochodnej bakteriochloryny in vitro i in vivo. Doktorantka w podrozdziale 4.1.1 na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdza, że „w przypadku komórek B16F10 oraz 2H11 odnotowano stymulujący wpływ światła o długości fali 760 nm na aktywność komórkową”. Co rozumie doktorantka przez „aktywność komórkową”? Czy pobudzenie proliferacji komórek? Jeśli tak, to jest to zastanawiająca obserwacja. Wielu badaczy oceniało wpływ samego światła na komórki i nie zaobserwowało podobnych zależności. Czy Doktorantka mogłaby skomentować uzyskane wyniki? Ta sama uwaga dotyczy wyników przedstawionych w podrozdziale 5.2.2. W rozdziale dotyczącym badania odpowiedzi komórek na terapię fotodynamiczną z zastosowaniem pochodnej bakteriochloryny moją wątpliwość budzą wyniki analizy komórek w cytometrii przepływowej w barwieniu jodkiem propidyny oraz aneksyną V skoniugowaną z FITC. Na rycinie 5.5.1 nie pokazano komórek kontrolnych, co należy do złotego standardu w opisywaniu tego rodzaju doświadczeń. Bez takiej informacji nie sposób odnieść się do wyników uzyskanych przez Doktorantkę. Doświadczenia opisane w rozdziale 6 dotyczące oceny wpływu PDT na unaczynienie i utlenowanie guza nie budzą zastrzeżeń. Wątpliwość budzą jedynie stwierdzenia typu: „barwienia (...) umożliwiły ocenę zmian w unaczynieniu NA POZIOMIE obecności antygenu charakterystycznego na naczyniach krwionośnych” (str. 146), „POZIOM VEGF” (str. 154), czy „gęstość naczyń SPADA” (str. 146) – są to kolokwializmy językowe, które nie powinny pojawiać się w tekście naukowym. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie przez Doktorantkę w tej części pracy licznych metod oceny unaczynienia, jak zbadanie przepływów w naczyniach powierzchniowych, ultrasonografia z badaniem przepływu krwi przez naczynia, tlenometria EPR, czy barwienia immunohistochemiczne. Opis wyników doświadczeń oceniających wpływ PDT na układ immunologiczny (choć właściwy termin to układ odpornościowy) budzi kilka wątpliwości. Co



dokładnie oznacza „fluktuacja poziomu makrofagów na średnim poziomie” (str. 157)? Jak Doktorantka dokonywała oceny obecności komórek zapalnych w preparatach guzów? W seryjnych przekrojach całego guza czy też w jednym wybranym przekroju? Przedstawione przez Doktorantkę w kolejnych podrozdziałach wyniki wykonanych techniką LUMINEX oznaczeń stężeń ponad 30 cytokin i czynników wzrostu w guzie niczego, w mojej opinii, nie wnoszą. Zwłaszcza, że poza opisem zmian ilościowych nie zawarto w pracy żadnego wytłumaczenia, czemu takie oznaczenia miałyby dokładnie służyć i jakich zmian można by oczekiwać w zależności od rodzaju zastosowanego schematu PDT. To podejście przypominające nieco strzelanie z armaty do wróbla, wykonane najprawdopodobniej z nadzieją, że „coś się znajdzie”. Nie znajduję racjonalnego uzasadnienia przeprowadzenia tak drogich badań, zwłaszcza w oparciu o nieliczne wyniki wstępnych eksperymentów.

Dyskusja jest dość obszerna, choć w większości jest powtórzeniem uzyskanych wyników a nie ich krytyczną analizą na tle dostępnej literatury. Niektóre stwierdzenia są niejako na wyrost, np. zdanie, że „komórki wyprowadzone z guzów są bardziej odporne na efekt fotodynamiczny” (str. 182). Wyciągnięcie takiego wniosku wymaga wcześniejszej oceny wrażliwości na PDT komórek prawidłowych i nowotworowych pobranych od tego samego osobnika, a nie porównania działania PDT w dość przypadkowych mysich i ludzkich ustalonych liniach komórkowych.

Wnioski przedstawione w punktach 1 do 7 są ponownym opisaniem uzyskanych wyników. W zupełności wystarczyłoby w tym miejscu jedynie ostatni akapit tego rozdziału.

Piśmiennictwo zostało przygotowane dość starannie, z nietypowym alfabetycznym wykazem cytowanych prac zamieszczonym pod koniec rozprawy. Liczy 191 pozycji. Choć taki sposób przedstawienia literatury jest bez wątpienia elegancki, w pewnym stopniu utrudnia on jej prześledzenie i redakcję uwag. W rozprawie w znakomitej większości cytowane są aktualne pozycje literatury światowej z zakresu poruszanej w pracy tematyki oraz najważniejsze prace historyczne opublikowane w prestiżowych czasopismach międzynarodowych. Niestety, Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów w tej części pracy. Dla przykładu: niepełne jest cytowanie rozdziału z monografii dotyczącego roli stresu oksydacyjnego w przebiegu terapii fotodynamicznej (pozycja 140. piśmiennictwa, brak nazwisk redaktorów książki oraz nazwy wydawnictwa). Ponadto, nigdy nie spotkałam się z artykułem wymienionym w pozycji 71. bibliografii, jednie z publikacją o tym samym tytule z PhotochemPhotobiolSci. z 2011 roku, której autorami są K Berg, J Golab, M Korbelik oraz D Russell. Również nie jest prawidłowe cytowanie prac przeglądowych na stronie 201 w dyskusji, gdyż Doktorantka opisuje w tym akapicie wnioski płynące z wyników przedstawionych w pracach eksperymentalnych.



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Immunologii
Centrum Biostruktury

ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa
tel.: 0-22-599-21-99, fax: 0-22-599-21-94
e-mail: immunologia@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl/immunologia

Na podkreślenie zasługuje niezwykle staranne przygotowanie rozprawy pod względem graficznym. Doktorantka nie ustrzegła się jednak dość licznych błędów edytorskich (jak brak przerw między kolejnymi wyrazami).

Mgr Martyna Krzykawska - Serdajest współautorem dwóch prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach z Listy Filadelfijskiej (w 2011 roku w ChemMedChem oraz w 2013 roku w Acta Biochimica Polonica). W żadnej z nich Doktorantka nie jest wiodącym autorem. W rozprawie doktorskiej, niestety, nie podano informacji na temat planów lub podjętych prób opublikowania uzyskanych wyników.

W podsumowaniu, mając na uwadze ogrom pracy laboratoryjnej włożony w przygotowanie ocenianej rozprawy oraz spełnienie wymogów stawianych pracom doktorskim, zwracam się do Wysokiej Rady o dopuszczenie mgr Martyny Krzykawskiej-Serdado dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,

dr hab. Dominika Nowis
Zakład Immunologii
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1A, budynek F
02-097 Warszawa