

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
WYDZIAŁ LEKARSKI
Prodziekan ds. Nauki
M. Podhorska-Okołów
prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okołów

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu DZIEKANAT WYDZIAŁU LEKARSKIEGO	
wpl. dnia	05-06-2017
L. dz. DJ	2135/17
Znak sprawy DJ	

Bytom, 05.06.2017r.

Dr hab. n. med. Aleksandra Kawczyk-Krupka
Adiunkt Katedry i Oddziału Klinicznego Chorób Wewnętrznych,
Angiologii i Medycyny Fizykalnej
Ośrodek Diagnostyki i Terapii Fotodynamicznej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Batorego 15, 41-902 Bytom
tel/fax: +48 32 7861630

Recenzja rozprawy na stopień naukowy doktora nauk medycznych

lek. Barbary Ziółkowskiej pt. „Ocena markerów autofagii w komórkach raka jelita grubego przed i po zastosowaniu terapii fotodynamicznej z użyciem kwasu 5-aminolewulinowego”, uczestnika studiów doktoranckich, z Katedry i Zakładu Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego (UM) we Wrocławiu, której promotorem jest Prof. dr hab. n. med. Piotr Ziółkowski.

Rozprawa doktorska lek. Barbary Ziółkowskiej została przygotowana w oparciu o wyniki własnych badań i jest napisana w sposób typowy dla rozpraw doktorskich z podziałem na rozdziały. Całość rozprawy liczy 112 stron, obejmuje 3 tabele i 26 rycin, w tym bogatą, czytelną i pięknie przygotowaną ilustrację zdjęciową badanych komórek w ocenie immunohistochemicznej. Tematem pracy doktorskiej była ocena poziomu ekspresji wybranych białek w komórkach nowotworowych przed i po zastosowaniu reakcji fotodynamicznej z użyciem kwasu 5-aminolewulinowego. Jest to praca eksperymentalna przeprowadzona w warunkach *in vitro* na komórkach gruczolakoraka jelita grubego linii SW620. Podjęty przez Doktorantkę cel pracy opiera się na najbardziej aktualnych kierunkach badań. Materiał i metodyka wynikają z najnowszej generacji technik badań podstawowych. Wyniki i wyciągnięte z nich wnioski, ich prezentacja i komentarze oraz sposób przeprowadzonej dyskusji, wskazują na skrupulatność i dojrzałość naukową lek. Barbary Ziółkowskiej.

1/ Ocena merytoryczna

Rozprawa doktorska lek. Barbary Ziółkowskiej została rzetelnie zrealizowana i zawiera wszystkie wymagane rozdziały dysertacji, które zostały poprawnie przygotowane i przedstawione.

W obszernym wstępie zawartym na 40 stronach, autorka w sposób jasny wprowadza czytelnika w meandry stosowanych przez Doktorantkę skomplikowanych technik, w tym na początku terapii fotodynamicznej, przedstawiając jej rys historyczny, mechanizm działania, w tym fotouczulaczy, płynnie przechodząc i koncentrując się na użytym przez siebie w eksperymencie kwasie 5-aminolewulinowym. W dalszej części wstępu Doktorantka opisuje reaktywne formy tlenu i mechanizmy ich działania doprowadzające do śmierci komórki poprzez peroksydację białek, lipidów i DNA, oraz mechanizmy obronne komórki, w tym enzymy biorące udział w procesach antyoksydacyjnych, przechodząc do zasadniczego aspektu badanego w pracy, którym jest autofagia, dokładnie opisana i bogato zilustrowana na wykonanych autorskich rycinach. Wstęp kończy podrozdział, w którym Autorka koncentruje się na etiologii raka jelita grubego, jego diagnostyce, czynnikach prognostycznych, leczeniu i rokowaniu. We wstępie Doktorantka odwołuje się do bogatego, właściwie dobraneo i aktualnego piśmiennictwa.

Obrany przez Autorkę cel pracy, którym była ocena skuteczności terapii fotodynamicznej oraz procesu autofagii w komórkach linii raka jelita grubego po zastosowaniu terapii fotodynamicznej, został trafnie obrany i świadczy o oryginalności pracy.

a/ Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność

Terapia fotodynamiczna uważana jest za nowatorską, skuteczną i najmniej inwazyjną wśród metod walki z rakiem. Za trafnością podjętej problematyki badawczej i oryginalnością przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej przemawia podjęcie tematu oceny skuteczności terapii fotodynamicznej, stosowanej na komórkach raka jelita grubego, w aspekcie cytotoksyczności, oceny markerów autofagii oraz zmian ich ekspresji pod wpływem stosowanej terapii fotodynamicznej z kwasem 5-aminolewulinowego.

W związku ze stale rosnącą umieralnością na nowotwory, problematyka leczenia raka była i jest trafna i szczególnie ważna w praktyce klinicznej.

Temat pracy i badane w niej zjawiska stanowią jak najbardziej aktualne zagadnienia. Udowodnionym jest, że zaburzenia autofagii mają związek z wieloma chorobami, takimi jak choroba Parkinsona, cukrzyca typu II oraz choroby nowotworowe. O aktualności problematyki poruszanej przez Autorkę świadczy fakt, iż to właśnie za odkrycia dotyczące mechanizmów autofagii, Nagrodę Nobla w 2016 r. w dziedzinie medycyny i fizjologii otrzymał Yoshinori Ohsumi.

b/ ocena uzyskanych rezultatów i ich znaczenie dla nauki i praktyki

Uzyskane rezultaty badawcze lek. Barbary Ziółkowskiej są dowodem na ścisłą współpracę nauk podstawowych i hipotetycznych możliwościach ich przełożenia na badania

kliniczne i stosowanie terapii fotodynamicznej w wybranych nowotworach. Autorka w swoim eksperymencie potwierdziła, iż terapia fotodynamiczna jest skuteczną formą niszczenia komórek rakowych. Badaniami immunohistochemicznymi oraz Western blot wykazała, wzrost ekspresji markerów autofagii, które narastają w czasie PDT, a tym samym udowodniła, że terapia fotodynamiczna doprowadza do śmierci komórki w mechanizmie autofagii. W ostatnim wniosku autorka podkreśla, iż wyniki jej doświadczeń stanowią krok do pogłębienia badań w celu oceny roli procesu autofagii w terapii przeciwnowotworowej.

Do najważniejszych osiągnięć Autorki w aspekcie ich znaczenia dla nauki i praktyki można zaliczyć potwierdzenie cytotoksycznego oddziaływania terapii fotodynamicznej na komórki raka, co może mieć hipotetycznie niezwykle istotne znaczenie w zastosowaniu tej formy terapii w badaniach klinicznych. Znaczenie powyższych rezultatów ma dużą wartość praktyczną, z punktu widzenia nowych strategii leczenia onkologicznego, opartych na spersonalizowanej terapii raka, a obejmujących metody konwencjonalne, takie jak chirurgia, radioterapia i chemioterapia, uzupełnione nowoczesnymi metodami onkologicznymi, do których zalicza się terapię fotodynamiczną i immunoterapię.

c/ poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna.

Poprawność językowa, stylistyczna i interpunkcyjna w przedstawionej do recenzji dysertacji nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka posługuje się poprawnym słownictwem, charakterystycznym dla prac naukowych, w sposób komunikatywny, jasny i nieskomplikowany potrafi opisać często złożone aspekty mechanizmów terapii fotodynamicznej, fotouczulaczy oraz metod badań cytotoksycznych, immunohistochemicznych i Western blot. W doktoracie można odnaleźć kilka drobnych błędów gramatycznych, interpunkcyjnych i stylistycznych, które w żadnym stopniu nie wpływają na całość przekazu merytorycznego i końcową wysoką ocenę bardzo precyzyjnie zaplanowanej i przeprowadzonej pracy.

2) Ocena metodologiczna

a) dobór literatury, umiejętności, wykorzystanie źródeł

Autorka przeprowadziła dogłębne studia literaturowe, umiejętnie dobrała i wykorzystwała literaturę przedmiotu. Niezwykle bogata bibliografia (262 pozycje) jest aktualna, merytorycznie ściśle związana z tematem dysertacji. Jednocześnie autorka cytuje zarówno autorów polskich jak i obcojęzycznych, z uznanym wkładem naukowym w zakresie diagnostyki i terapii fotodynamicznej.

Doktorantka przedstawia dyskusję na 7 stronach rozprawy. Obejmuje ona zarówno analizę własnych wyników, jak również przegląd dostępnej literatury oraz konfrontuje własne wyniki z rezultatami badań innych autorów. Dyskusja napisana jest ładnym, zrozumiałym i „lekkim” językiem. W rozdziale tym Doktorantka interpretuje uzyskane przez siebie wyniki badań, uzasadnia oraz w właściwy i dojrzały sposób stara się na podstawie danych literaturowych innych autorów wyjaśnić mechanizmy odpowiedzialne za uzyskane w pracy wyniki. Jednocześnie w sposób przemyślany tłumaczy istotę i przyczyny odmienności uzyskanych wyników w komparacji do istniejących w literaturze. Styl Doktorantki cechuje z jednej strony zwięzłość i logika wywodu, z drugiej zaś strony bogactwo języka, co sprawia, że rozdział „Dyskusja” czyta się dobrze.

Cytowane piśmiennictwo w przeważającej części to publikacje z ostatnich lat. Spis piśmiennictwa sporządzony jest w kolejności pojawiania się w tekście oraz według obowiązujących wytycznych przygotowywania prac doktorskich.

b/ Poprawność formułowania problemów i hipotez (założenia badawcze)

Autorka poprawnie formułuje założenia badawcze. Podkreśla związek swoich badań z możliwością praktycznego wykorzystania terapii fotodynamicznej w nowatorskim schemacie leczenia onkologicznego, jednocześnie zastrzega, iż przeprowadzone badania charakteryzują się ograniczeniami, z uwagi na ich charakter „*in vitro*” i odległą byłaby ich bezpośrednia interpolacja kliniczna na pacjentów. W części „Cel i założenia pracy”, Autorka postanowiła określić działanie cytotoksyczne terapii fotodynamicznej z zastosowaniem kwasu 5-aminolewulinowego, dokonać oceny markerów autofagii i zmian ich ekspresji. Doktorantka w sposób jasny i konkretny odpowiada we wnioskach na założone cele badawcze. Wnioski, wynikające z badań, formułuje prawidłowo i jednoznacznie.

c) trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętności ich zastosowania

Doktorantka przedstawia w załączonych pracach dokładny opis całej procedury badawczej oraz oznaczeń poszczególnych czynników. Przedstawiona charakterystyka wymienionych metod nie budzi zastrzeżeń. W eksperymentach autorka użyła komórki raka jelita grubego linii SW620, które w przeprowadzonym doświadczeniu inkubowała cztery godziny z kwasem 5-aminolewulinowym (ALA), a następnie przez 75 sekund naświetlała światłem o długości fali 630nm (+20nm) uzyskanym z lampy halogenowej z filtrem czerwonym, o mocy promieniowania 4,5J/cm² i w dawce promieniowania 60mW/cm². Do oceny żywotności komórek Autorka zastosowała prawidłową metodologię, stosując metodę kolorymetryczną z MTT. Oceny markerów autofagii (LC3, Bekliny 1 i ATG7) Doktorantka dokonała z wykorzystaniem badań immunohistochemicznych, polegających na wykrywaniu

w komórkach substancji o charakterze antygenowym przy pomocy znakowanych poliklonalnych przeciwciał króliczych renomowanych producentów zestawów do tego typu badań. Detekcji białek oraz zmian ich ekspresji w trakcie terapii fotodynamicznej, Autorka dokonała badaniem Western blot, uznanym w biologii molekularnej za najlepszą metodę identyfikacji tych polikondensatów.

Analizę statystyczną lek. Barbara Ziółkowska przeprowadziła za pomocą programu Statistica 12. Normalność rozkładu zweryfikowała testem normalności Shapiro-Wilka, a ze względu na brak normalności rozkładów analizowanych parametrów, posłużyła się prawidłowo testem U Manna-Whitneya oraz stanowiącym jego rozszerzenie testem ANOVA Rang Kruskala-Wallis. Z poziom istotności Autorka przyjęła $p=0.05$.

Na pochwałę zasługuje przejrzysta prezentacja wyników, zobrazowanie graficzne i zdjęcia oraz ich jasny opis i komentarz.

d) poprawność układu pracy i struktury podziału treści

Układ pracy i struktura podziału treści odpowiada standardom prac doktorskich pisanych w uniwersytetach medycznych. Wymogi dotyczące formalnej strony pracy zostały w dysertacji lek. Barbary Ziółkowskiej spełnione. Prawidłowy jest układ pracy, kolejność rozdziałów oraz cytowania. Rozprawę rozpoczynają: spis treści, wykaz stosowanych skrótów, po którym następują: wstęp, cel i założenia pracy oraz materiał i metody, które przedstawione są w bardzo przystępny sposób. Kolejne rozdziały stanowią bogato zilustrowane wyniki badań oraz wnioski z nich wynikające. Ostatnie rozdziały pracy stanowią: dyskusja, streszczenia w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo oraz spis tabel i rycin.

Reasumując, pracę doktorską lek. Barbary Ziółkowskiej oceniam wysoko. Autorka przedstawiła ciekawe wyniki badań w oparciu o dobrze dobrany model badań z użyciem specjalistycznej aparatury naukowo-badawczej. Doktorantka dowiodła, że potrafi zaprojektować i przeprowadzić ciekawy, nowatorski eksperyment naukowy, z wykorzystaniem najnowszej generacji technik immunohistochemicznych, opracować uzyskane wyniki badań, wyciągnąć prawidłowo wnioski, skonfrontować z dostępnym piśmiennictwem, a następnie w sposób przejrzysty przedstawić je czytelnikowi.

Obowiązkiem recenzenta rozprawy doktorskiej jest nie tylko podkreślenie zalet dysertacji, ale także zwrócenie uwagi Doktorantce na niedoskonałości, odnotowane w trakcie lektury manuskryptu, które były nieliczne. Należą do nich:

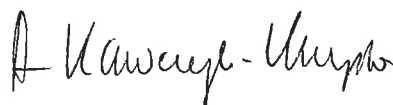
1. W spisie treści brak punktu: Wnioski;
2. Podpisy tabel powinny znajdować się nad tabelą;

3. Drobne błędy językowe i stylistyczne;
4. Brak jest słów kluczowych;
5. Brak jest tytułu rozprawy doktorskiej w języku w angielskim.

3) Wniosek końcowy (konkluzja)

Szczegółowa i wnikliwa ocena osiągnięć naukowo-badawczych lek. Barbary Ziółkowskiej upoważnia mnie do wyrażenia wysoce pozytywnej opinii. Imponująca jest zgromadzona wiedza, metodyka prac i uzyskane wyniki, czytanie Autorki i przedstawione piśmiennictwo, które stanowiło źródło pomysłu i stanowiło inspirację dla podjętych hipotez badawczych. Świadczą one nie tylko o dużej wiedzy Doktorantki, lecz również intuicji naukowej, umiejętnościach eksperymentatorskich, skrupulatności i doskonałym warsztacie naukowym Doktorantki. Dojrzałość naukowa lek. Barbary Ziółkowskiej poparta jest zdolnością do analitycznego myślenia i trafnego wyciągania wniosków, umiejętnością konfrontacji własnych wyników z opisanymi przez innych autorów. Styl Doktorantki, naukowy, zwięzły i logiczny (patrz „Cel i założenia pracy”, „Wyniki”, „Wnioski”), jednocześnie cechuje „lekkość pióra” i bogactwo języka (patrz „Wstęp” i „Dyskusja”). Skrupulatność w przeprowadzaniu eksperymentów, rzeczowość, interpretacja wyników oraz zasadne, a jednocześnie pełne umiaru próby ich transponowania na badania kliniczne udowadniają, że lek. Barbara Ziółkowska jest dojrzałym pracownikiem naukowym, w pełni zdolnym do realizowania samodzielnych, twórczych idei naukowych.

Jednocześnie opiniowana dysertacja lek. Barbary Ziółkowskiej spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim a określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r, nr 65 poz 595 z późniejszymi zmianami) i na tej podstawie wnioskuję o dopuszczenie lek. Barbary Ziółkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie składam wniosek o jej wyróżnienie z uwagi na wysoki poziom recenzowanej dysertacji, wysoką wartość naukową i istotny wkład uzyskanych wyników w rozwój terapii fotodynamicznej jak i możliwość ich praktycznego zastosowania w przyszłości w terapii pacjentów onkologicznych.



Bytom, 05.06.2017

Aleksandra Kawczyk-Krupka

ADIUNKT
Katedry i Oddziału Klinicznego Chorób Wewnętrznych
Angiologii, Medycyny Fizykalnej SUM
Dr hab. n. med. Aleksandra Kawczyk-Krupka
Specjalista Chorób Wewnętrznych,
Chorób Naczyni, Balneologii i Medycyny Fizykalnej
3285716