

Prof. n. tech. dr hab. n. fiz. inż. lek. med. Halina Podbielska  
Katedra Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej  
Wydział Podstawowych Problemów Techniki  
Politechnika Wroclawska  
50-370 Wrocław  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27

## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

### ***Ocena poziomu ekspresji wybranych białek w komórkach nowotworowych przed i po zastosowaniu reakcji fotodynamicznej z użyciem kwasu 5-aminolewulinowego***

**Autor rozprawy: mgr biologii Marta Woźniak**  
**Promotor: Prof. dr hab. n. med. Piotr Ziolkowski**  
**Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu**

Recenzję rozprawy doktorskiej sporządzono na prośbę Dziekana Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu Pani prof. dr hab. Małgorzaty Sobieszcańskiej wyrażoną w piśmie DL/N/2595/16 datowanym na 27.05.2016 w związku z powierzeniem obowiązków recenzenta przez Radę Naukową Wydziału Lekarskiego (Uchwała Rady Nr 803/05/2016).

#### **Dane na temat rozprawy**

Z załączonych danych wynika, że rozprawa powstała w wyniku realizacji projektu badawczego *Rola wybranych białek regulatorowych w odpowiedzi komórki nowotworowej na terapię fotodynamiczną*, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki NN401196539. Rozprawa stanowi zbiór trzech opublikowanych współautorskich prac naukowych w liczących się czasopismach o współczynniku wpływu *Impact Factor* powyżej 2 (sumaryczny IF wynosi 7,4). W dwóch pracach Autorka rozprawy jest pierwszym Autorem, a w jednej publikacji drugim. Do rozprawy dołączono oświadczenia współautorów, a Doktorantka szczegółowo opisała swoją rolę w powstaniu publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora. W rozprawie zamieszczono także, zgodnie z wymaganiami ustawowymi, streszczenie w języku polskim i angielskim.

Opis wyników, podsumowanie i wnioski są niestety dość zdawkowo potraktowane. Pewien niedosyt wynika z tego, że nie ma wyodrębnionego rozdziału poświęconego stanowi

badania w tematyce rozprawy doktorskiej. Według *Art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* rozprawa doktorska powinna „wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej”. Przewodnik po publikacjach jednakże nie zawiera takiego odrębnego rozdziału. Niemniej jednak Doktorantka jest w pewien sposób usprawiedliwiona, gdyż publikacje stanowiące podstawę rozprawy poruszają ten problem w miarę wyczerpująco. W publikacji *Immunocytochemical studies on the nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate following 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 cells* zacytowano 45 prac, w publikacji *Early induction of stress-associated Src activator/Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 10 protein following photodynamic therapy* zacytowano 22 prace, a w publikacji *Insulin-Like Growth Factor-2 Is Induced Following 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Photodynamic Therapy in SW620 Human Colon Cancer Cell Line* – 26 prac.

### **Ocena aktualności zagadnień poruszanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej**

W ostatnich latach obserwujemy niezwykle rozwój w dziedzinie biomedycznych badań podstawowych, jak i w poszukiwaniu małoinwazyjnych procedur terapeutycznych i diagnostycznych. Wiele prowadzonych obecnie na świecie projektów badawczych związanych jest z szeroko rozumianymi badaniami podstawowymi, dotyczącymi struktur komórkowych i subkomórkowych. Badania w skali mikro- i nano są obiektem zainteresowania współczesnej inżynierii biomedycznej, nauk chemicznych i biochemii, biologii molekularnej, a także wkraczają do praktyk klinicznych; zarówno w diagnostyce, jak i w terapii.

Wiele prowadzonych badań związanych jest z wykorzystaniem światła, w tym promieniowania w widzialnym zakresie widma, ultrafioletowego lub podczerwonego. Nowe i rozwijające się techniki są przedmiotem badań podstawowych, jak również klinicznych. Wyjaśnienie przyczyn wielu schorzeń oraz zrozumienie zjawisk, zachodzących w organizmach żywych, może przyczynić się do wdrożenia lepszych procedur klinicznych, bardziej dokładnych i bardziej przyjaznych dla pacjenta. Najlepszym tego przykładem jest rozwijająca się obecnie medycyna laserowa, szczególnie w oftalmologii czy dermatologii, a także medycyna fotodynamiczna. Metody fotodynamiczne znalazły już uznane bezpośrednie aplikacje kliniczne (np. w przypadku raków podstawnokomórkowych, przełyku Baretta etc.). Prace badawcze w tej dziedzinie koncentrują się z jednej strony na dozymetrii, czyli poszukiwaniu optymalnych dawek światłouczulacza i natężenia promieniowania, a z drugiej strony na badaniu odpowiedzi organizmów żywych na terapię fotodynamiczną na poziomie

poszczególnych procesów komórkowych (transkrypcja, metabolizm, proliferacja, apoptoza), a więc są to prace związane z badaniem oddziaływania na poszczególne białka. W naszym kraju również prowadzone są szeroko zakrojone prace w tej tematyce, a grupa prof. Piotra Ziółkowskiego należy tu do wiodących ośrodków w kraju, jeśli chodzi o badania na liniach komórkowych.

Recenzowana rozprawa Pani Marty Woźniak wpisuje się doskonale w nurt badań związanych z medycyną fotodynamiczną. Praca dotyczy aktualnego i ważnego aspektu, a mianowicie analizy ekspresji wybranych białek po oddziaływaniu fotodynamicznym.

### **Ocena osiągnięć stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora**

Doktorantka wyznaczyła sobie ambitne zadanie, a mianowicie zbadanie zmian ekspresji wybranych białek w komórkach nowotworowych gruczolaka jelita grubego (linia SW620) oraz piersi (MCF7). Dobór materiału badawczego jest jak najbardziej uzasadniony, gdyż są to jedne z najczęściej występujących nowotworów. O ile jednak próbuje się stosować terapię fotodynamiczną w przypadku raka jelita grubego, to prawie nie ma takich prób w przypadku raka piersi. Wynika to pewnie ze słabej dostępności miejsca terapii, słabej penetracji wiązki świetlnej, czy też trudności z doбором światłouczulacza i odpowiedniego jego stężenia. Dobrze by było, żeby Doktorantka ustosunkowała się do tego problemu np. podczas obrony.

Badając wpływ oddziaływań fotodynamicznych, Autorka wykorzystywała znane metody immunocytochemiczne, a także metody wykrywania białek (Western blot), testy immunoenzymatyczne (ELISA), a także metodę TUNEL do badania DNA (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), która ma zastosowanie w detekcji apoptozy. Jednakże, opisując poszczególne prace, nie zagłębiała się w wyjaśnienia, dlaczego wybrała takie metody badań. Rozprawa by na pewno zyskała, gdyby opisy prac były bardziej pogłębione, również w części dotyczącej warsztatu badawczego.

Pierwsza publikacja włączona do rozprawy, zatytułowana *Immunocytochemical studies on the nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate following 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 cells* została opublikowana w 2013 roku w czasopiśmie *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Badania prowadzono na komórkach raka piersi MCF-7. Głównym obiektem badań było białko NUCKS (Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate), związane z procesami nowotworowymi i przerzutami oraz jego rola podczas stresu fotooksydacyjnego.

Druga praca *Early induction of stress-associated Src activator/Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 10 protein following photodynamic therapy* opublikowana

została w tym samym czasopiśmie, w 2014 roku. Badania zaprezentowane w tej publikacji dotyczą wpływu stresu oksydacyjnego na aktywację kinazy tyrozynowej c-Src, związanej z progresją choroby nowotworowej, chroniącej komórki nowotworowe przed apoptozą. Białko C9orf10 (Homo sapiens chromosome 9 open reading frame10) odgrywa podobną, rolę chroniącą przed apoptozą poprzez uruchomienie kinazy c-Src i nazywane jest aktywatorem kinazy pod wpływem stresu oksydacyjnego (Ossa - oxidative stress-associated Src activator). Badania te prowadzono również na linii komórkowej raka piersi.

Trzecia praca *Insulin-Like Growth Factor-2 Is Induced Following 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Photodynamic Therapy in SW620 Human Colon Cancer Cell Line* opublikowana została w International Journal of Molecular Sciences w 2015 roku. Badania te poświęcono insulinopodobnemu czynnikowi wzrostu 2 (IGF-2 Insulin-like growth factor 2) oraz związanemu z nim białku IGF-2 BP1 (IGF-2 binding protein). Badania prowadzono na komórkach raka jelita grubego. Wysokie stężenia IGF-2 związane są z procesem karcynogenezy.

Powyższe prace zaowocowały wieloma ciekawymi wnioskami. Do głównych osiągnięć, które zostały opublikowane w cyklu publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, należy zaliczyć:

1. Wykazanie zmian ekspresji białka NUCKS po oddziaływaniu fotodynamicznym na komórki raka piersi MCF-7 oraz zmian w lokalizacji tego białka.
2. Pokazanie zależności immunoreaktywności białka Ossa w zależności od czasu po działaniu fotodynamicznym na komórki raka piersi MCF-7.
3. Wykazanie wpływu reakcji fotodynamicznej na wzrost IGF-2 w komórkach raka jelita grubego SW620.

Doktorantka wspomina również, że potwierdziła hipotezę wskazującą na zależność pomiędzy białkiem Ossa a kinazą c-Src. Jednakże w bardzo wielu pracach wykazano już taką zależność, trudno to więc nazwać hipotezą.

W rozprawie zabrakło jednak bardziej szczegółowego podsumowania wyników opublikowanych prac, stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora. Mile widziane byłoby, gdyby przewodnik po publikacjach wskazywał też na kierunki dalszych badań i wykorzystania w tym celu osiągniętych wyników, w szczególności w kontekście aplikacji klinicznych. Przykładowo, czy zaobserwowane zmiany badanych białek w wyniku oddziaływań fotodynamicznych mogłyby znaleźć zastosowanie jako swoiste biomarkery lub też czy przeprowadzone badania wskazują na optymalny czas naświetlania lub/i optymalne

stężenie kwasu 5-aminolewulinowego, które powinny być stosowane?

Jednakże wspomniane w recenzji usterki i uchybienia nie podważają całości osiągnięć Autorki. Poza publikacjami stanowiącymi podstawę rozprawy Doktorantka ma też na swoim koncie dość bogaty dorobek, związany z badaniem białek, markerów i badaniami immunohistochemicznymi.

### **Wnioski końcowe**

Publikacje będące podstawą recenzowanej rozprawy stanowią wartościowe pozycje o dużych walorach poznawczych. Należy też zaznaczyć, że badania Autorki powinny być kontynuowane, gdyż zastosowanie podejścia fotodynamicznego może być pomocne w terapii w przypadkach obecnie nieleczonych tą metodą. Reasumując, stwierdzam, że praca spełnia wymagania wspomniane w regulujących te kwestie dokumentach (*Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz.U. Nr 65 z dnia 16 kwietnia 2003 r., poz. 595 z późn. zm. oraz odpowiednie Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora*).

Mając zatem na uwadze osiągnięte wyniki oraz obowiązujące przepisy o stopniach i tytułach naukowych, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego o dopuszczenie Pani Marty Woźniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. n. tech. dr hab. n. fiz. inż. lek. med. Halina Podbielska