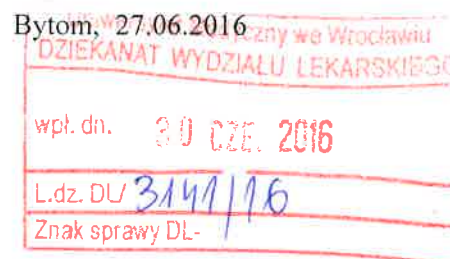


Dr hab. n. med. Aleksandra Kawczyk-Krupka  
Adiunkt Katedry i Oddziału Klinicznego Chorób Wewnętrznych,  
Angiologii, Medycyny Fizykalnej  
Ośrodek Diagnostyki i Terapii Fotodynamicznej  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego  
ul. Batorego 15, 41-902 Bytom  
tel/fax: +48 32 7861630



Recenzja pracy doktorskiej mgr biologii Marty Woźniak

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

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr biologii Marty Woźniak została wykonana w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, pod opieką promotora Prof. dr hab. n. med. Piotra Ziółkowskiego.

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*. Doświadczeniae wykonano na komórkach gruczolakoraka jelita grubego linii SW620 oraz raka piersi MCF-7.

#### **1/ Ocena merytoryczna**

Rozprawa doktorska lek. med. Marty Woźniak ma formę spójnego tematycznie zbioru trzech artykułów:

1/ Hotowy K, Woźniak M, Duś K, Czapińska E, Osiecka B, Krzystek-Korpacka M, Bronowicz A, Wiśniewski J, Gamian A, Terlecki G, Ziółkowski P. Immunocytochemical studies on the nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate following 5-aminolevulinicacid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 cells. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2013 Dec;10(4):518-25. doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.03.009. Epub 2013 Apr 18. PMID: 24284105

2/ Woźniak M, Hotowy K, Czapińska E, Duś-Szachniewicz K, Szczuka I, Gamian E, Gamian A, Terlecki G, Ziółkowski P. Early induction of stress-associated Src activator/Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 10 protein following photodynamic therapy. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2014 Mar;11(1):27-33. doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.11.002. Epub 2013 Nov 23. PMID: 24280438

3/ Woźniak M, Duś-Szachniewicz K, Ziółkowski P. Insulin-Like Growth Factor-2 Is Induced Following 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Photodynamic Therapy in SW620 Human Colon Cancer Cell Line. *Int J Mol Sci.* 2015 Oct 2;16(10):23615-29. doi: 10.3390/ijms161023615.PMID: 26445041

W dwóch pracach doktorantka jest pierwszym autorem, w jednej drugim. Łączny impact factor wynosi 7.4, a MNiSW: 75punktów.

Rozprawa doktorska mgr Marty Woźniak liczy 68 stron i podzielona została na rozdziały: Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, Streszczenie, Wprowadzenie, Cel projektu badawczego, Publikacje, Podsumowanie i wnioski, Załączniki, w tym dorobek naukowy, opinia komisji bioetycznej, oświadczenia o współautorstwie. Całość napisana jest w przejrzysty i zrozumiały sposób, a jednocześnie poruszający niezbędne zagadnienia związane z tematem pracy. Dorobek naukowy doktorantki liczy 10 prac oryginalnych o łącznym IF 22,697, 1 pracę pogładową, 1 monografię oraz 26 doniesień zjazdowych. Praca doktorska nadzorowana była przez Prof. dr hab. Piotra Ziółkowskiego, który w swojej dotychczasowej bogatej pracy naukowej również badał wpływ PDT na komórki nowotworowe w doświadczeniach przeprowadzonych w warunkach *in vitro*.

#### **a/ Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność**

Za trafnością podjętej problematyki badawczej i oryginalnością przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej przemawia podjęcie tematu poszukiwania nowych białek-biomarkerów i ich roli w procesie nowotworowym, w tym podczas terapii fotodynamicznej, która uważana jest za nowatorską, skuteczną i najmniej inwazyjną wśród metod walki z rakiem. Stanowi ona element terapii spersonalizowanej, która jest najnowszą formą leczenia onkologicznego. Istotą medycyny spersonalizowanej jest dobór optymalnych form terapii do konkretnych grup pacjentów, posługując się tzw. czynnikami predykcyjnymi i wykorzystując znajomość biomarkerów decydujących o procesie progresji raka, pozwala dobrać i przewidywać, czy określona terapia okaże się skuteczna u danego pacjenta. Medycyna spersonalizowana opiera się na ścisłej współpracy między diagnostami a klinicystami. O oryginalności przeprowadzonych przez Doktorantkę eksperymentów, polegających na badaniu biomarkerów nowotworowych, świadczy fakt, iż oznaczenia te wpisują się w opisaną powyżej medycynę spersonalizowaną, zwaną precyzyjną, stanowiącą nowoczesny kierunek współczesnej onkologii.

We wprowadzeniu Autorka w zwięzły i jasny sposób przedstawia uzasadnienie wyboru i istotność problemu poruszanego w pracy. Światowe analizy statystyczne

potwierdzają dużą śmiertelność wywołaną chorobami nowotworowymi, której przyczynami są zarówno czynniki środowiskowe, lecz także niewłaściwe postępowanie profilaktyczne, diagnostyczne i terapeutyczne. Dotychczas powszechnie stosowane metody leczenia przeciwnowotworowego, takie jak leczenie chirurgiczne, radio- czy chemioterapia, niosą za sobą duże ryzyko działań niepożądanych, co przyczynia się często do niepowodzenia terapii. W związku ze stale rosnącym odsetkiem umieralności na nowotwory, poszukiwane są nowe, skuteczne metody terapeutyczne, obarczone jak najmniejszym ryzykiem działań niepożądanych. Problematyka leczenia raka była i jest trafna i szczególnie ważna w praktyce klinicznej.

Jedną z takich metod, coraz częściej wykorzystywaną w onkologii jest terapia fotodynamiczna (PDT). Autorka opisuje rolę i mechanizmy działania terapii fotodynamicznej, która jest skutecznie stosowana w praktyce klinicznej już od ponad trzydziestu lat. W kolejnym akapicie Wprowadzenia Doktorantka przedstawia główny cel badań, prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy, którym była charakterystyka zmian ekspresji wybranych białek w komórkach nowotworowych gruczolaka jelita grubego SW620 oraz komórkach nowotworu piersi- linii MCF-7. Autorka podkreśla rolę analizy mechanizmów biologicznych komórek w odpowiedzi na stres oksydacyjny spowodowany terapią fotodynamiczną, która wydaje się być kluczowa dla możliwości skuteczniejszego oddziaływania na te nowotwory odpowiednimi metodami terapeutycznymi. Dalej Doktorantka opisuje kwas 5-aminolewulinowy (ALA), który jest uznanym w świecie składnikiem terapii fotodynamicznej, związkem endogennym, prekursorem właściwego fotouczulacza, Protoporfiryny IX.

**W pierwszym artykule: "Immunocytochemical studies on the nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate following 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 cells",** autorka badała wpływ reakcji fotodynamicznej na białko NUCKS (Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate), zawiadujące, o czym świadczą doniesienia literaturowe, wzrostem guza i powstawaniem przerzutów. Warto nadmienić, że białko to znalazło się na międzynarodowej liście Biomarker Profiles Corporation.

Przedmiotem eksperymentu były komórki raka piersi linii MCF-7, pozyskane z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN z Wrocławia.

Hodowla komórek była prowadzona w sposób standardowy. Następnie komórki poddano działaniu kwasu 5-aminolewulinowego 6,5mM (na nośnik liposomowym), w dalszej kolejności naświetlano z zastosowaniem lampy halogenowej (Penta Lamps, Teclas,

Szwajcaria) światłem o długości fali  $630 \pm 20 \text{ nm}$  z filtrem do całkowitej dawki światła  $10 \text{ J/cm}^2$  i natężeniu światła (gęstości mocy)  $60 \text{ mW/cm}^2$ . Doktorantka badała żywotność komórek raka testem MTT (redukcji soli tetrazolowej do nierozpuszczalnego formazanu), powszechnie uznanym do tego typu pomiaru. Ekspresję białka w komórkach raka piersi MCF-7 badano metodą Western blot. Rozdziału elektroforetycznego autorka dokonała z

użyciem techniki SDS-PAGE (ang. SDS polyacrylamide gel electrophoresis), która pozwala

w pełni uniezależnić proces rozdzielania białek od ich kształtu i ładunku elektrycznego. W kolejnym etapie pracy doktorantka wykorzystowała metodę immunocytochemii (IHC) dla zobrazowania ekspresji białek NUCKS, Bcl-2 oraz Bax, która pozwala na wykrycie oraz lokalizację składników komórek i tkanek, wykorzystując zasadę powinowactwa antygeny i przeciwciała i uwidocznienie tego zjawiska w preparatach mikroskopowych. Doktorantka uzyskała mikrofotografie przy użyciu Mikroskopu Olympus BX-51 wyposażonego w kamerę cyfrową. Analiza statystyczna została dokonana przez Autorkę przy użyciu programu Microsoft Excel. Mgr Marta Woźniak odnotowała w 7 godzinie od naświetlania nie tylko najwyższą ekspresję powyższego białka, ale także zmianę jego lokalizacji z jądrowej na jądrowo-cytoplazmatyczną. Następnie w 18 i 24 godzinie od naświetlania nastąpił spadek intensywności reakcji immunoenzymatycznej badanego białka. Autorka nie odnotowała natomiast ekspresji białka Bcl-2 po 5-ALA oraz ALA-PDT, podczas gdy ekspresja białka Bax została odnotowana bezpośrednio po ALA PDT a następnie w 24godzinie po reakcji fotodynamicznej z ALA.

W Dyskusji Autorka zwróciła uwagę na fakt, iż terapia fotodynamiczna jest uznawana za czynnik aktywujący stres oksydacyjny z wczesną odpowiedzią genów i białek, co wpływa na proliferację komórek oraz aktywację przeżycia komórek poprzez różne szlaki przekazywania komórkowego. Doktorantka w pracy potwierdziła indukcję białek NUCKS i Bax (czynnik proapoptyczny), redukcję białka Bcl-2 (czynnik antyapoptyczny), co przemawia za ekspresją powyższych białek w komórkach raka na skutek stresu oksydacyjnego oraz udział białka NUCKS w antyapoptycznej odpowiedzi komórkowej na stres oksydacyjny wywołany reakcją fotodynamiczną już w kilka godzin od naświetlania. Ponadto Doktorantka wykazała, iż białko to nie tylko utrzymuje aktywność transkrypcyjną niektórych genów, ale jego relokacja może chronić komórki przed mechanizmem programowanej śmierci komórki.

Piśmiennictwo podane przez Autorkę jest dobrze dobrane, bogate (45 pozycji) i obejmuje w większości prace publikowane po 2010r.

**W kolejnej pracy: “Early induction of stress-associated Src activator/Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 10 protein following photodynamic therapy”**, Autorka pioniersko analizuje wpływ stresu oksydacyjnego na aktywność kinazy tyrozynowej należącej do rodziny c-Src kinaz wraz z białkiem Ossa (Oxidative stress-associated Src activator, Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 10 protein- C9orf10), chroniącym komórki nowotworowe przed apoptozą i będącym potencjalnym celem w terapii raka.

Przedmiotem badań były również ludzkie komórki raka piersi linii MCF-7. Hodowla komórek była prowadzona w sposób standardowy. Następnie komórki poddano 4-godzinnej inkubacji z kwasem 5-aminolewulinowym, w dalszej kolejności naświetlano z zastosowaniem lampy halogenowej o parametrach podanych wyżej.

W tej pracy Doktorantka także wykorzystowała metodę immunocytochemii (IHC), a mikrofotografie uzyskała przy użyciu Mikroskopu Olympus BX-51 wyposażonego w kamerę cyfrową.

W kolejnym etapie eksperymentu mgr Marta Woźniak wykorzystowała metodę Western blot do detekcji pojedynczych białek c-Src oraz Ossa w supernatancie komórkowym. W metodzie tej białka podlegają rozdzielaniu z zastosowaniem elektroforezy. Następnie zostają uruchomione na specjalnej membranie i barwione przeciwciałami. Białka komórkowe muszą zostać uwolnione z komórek. Do tego celu autorka zastosowała bufor do lizy (SDS, DTT, PMSF). Stężenie białka było mierzone spektrofotometrycznie (Nanodrop 2000, Thermo Fischer Scientific, Inc). Rozdział białek nastąpił po przeprowadzeniu elektroforezy w żelu zawierającym SDS. Po zakończeniu transferu białek autorka stosowała bufor blokujący: PBS+0,1% Tween 20. W następnym etapie doktorantka zastosowała inkubację membrany z pierwszorzędowymi przeciwciałami (króliczymi), skierowanymi swoiście przeciwko białkom c-Src oraz Ossa w temperaturze 4°C. Przeciwciała te są zazwyczaj niewyznakowane enzymem i wymagają zastosowania przeciwciał drugorzędowych (wyznakowanych) skierowanych przeciwko nim samym. W tym celu Doktorantka użyła poliklonalnych przeciwciał kozich skierowanych przeciwko przeciwciałom pierwszorzędowym.

Wyniki zostały opracowane z użyciem aparatury Bio-Rad (Molecular Imager Gel Doc TMXR+). Wyżej opisana metodyka jest powszechnie stosowana w tego typu oznaczeniach.

Autorka dokonała analizy statystycznej z użyciem testu t Studenta (do porównania różnic pomiędzy średnimi grupy badanej i kontrolnej dla n=3) i programu Statistica.

Doktorantka w eksperymencie wykazała, iż zastosowanie reakcji fotodynamicznej z ALA obniża ekspresję białka c-Src w 7 godzinie po naświetlaniu, z następowym wzrostem ekspresji tej kinazy w 24 godzinie. Odwrotna zależność została odnotowana dla białka Ossa, którego ekspresja w 7 godzinie po reakcji fotodynamicznej spadła.

Zdaniem autorki, popartym danymi literaturowymi, fluktuacje ekspresji powyższych białek wskazują, że aktywacja białka Ossa przez kinazy Src może chronić komórki nowotworowe przed apoptozą indukowaną stresem oksydacyjnym spowodowanym reakcją fotodynamiczną.

**Ostatnia praca Doktorantki, zamykająca tryptyk dysertacji, pt. „Insulin-Like Growth Factor-2 Is Induced Following 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Photodynamic Therapy in SW620 Human Colon Cancer Cell Line”** analizuje działanie ALA PDT na kolejny istotny czynnik decydujący między innymi o progresji komórek raka, którym jest insulinopodobny czynnik wzrostu 2 (IGF-2). Wybór tego białka do eksperymentów potwierdza nowatorski charakter doktoratu. Insulinopodobne czynniki wzrostu (IGF), należące do rodziny polipeptydowych czynników wzrostu, odgrywają bowiem istotną rolę we wzroście komórek. Insulinopodobny czynnik wzrostu IGF-2, zwany Somatomedyną A, dodatkowo stanowi istotny czynnik proliferacyjny i regulujący metabolizm komórkowy. Patomechanizm działania IGF w karcynogenezie jest złożony. Peptyd ten oddziałuje na wszystkie stadia cyklu komórkowego. Aktywuje ekspresję białek serii erbB (receptorów komórkowych dla czynników wzrostu), uczestniczy w fosforylacji onkogeny c-Jun oraz w fosforylacji inhibitora ontogenezy p53. Ponadto aktywuje kinazy serynowe, czynnik transkrypcyjny Nf kappa, aktywujący regiony promotorowe niektórych onkogenów oraz białka grupy cyklin. W wielu częstych typach nowotworów, w tym raku jelita grubego, występuje zwiększona ekspresja IGF-2 która odgrywa istotną rolę w neogenezie nowotworu. Wydzielany IGF-2 przez komórki nowotworowe oddziałuje także miejscowo w mechanizmie auto- i parakrynnym, sprzyja procesowi karcynogenezy, proliferacji komórek raka i ma działanie antyapoptocyczne w stosunku do komórek nowotworowych. W ostatnich latach trwają intensywne prace nad terapią genową nowotworów. Kaskady sygnałowe pośredniczące w działaniach IGF-2 stanowią cele nowych strategii terapeutycznych. Sugeruje się na przykład, iż blokowanie działania IGF-IR z wykorzystaniem antysensownych nukleotydów lub specyficznych przeciwciał może być czynnikiem w terapii nowotworów złośliwych. W związku z powyższym wybór tego białka jako przedmiotu badań w aspekcie oddziaływania terapii fotodynamicznej, świadczy o właściwie postawionych hipotezach pracy przez Doktorantkę.

Celem tej pracy mgr Marty Woźniak była ocena wpływu stresu oksydacyjnego wywołanego reakcją fotodynamiczną z zastosowaniem kwasu 5-aminolewulinowego na ekspresję białek: IGF-2, receptora dla IGF-2 (IGF-2R), IGF2-BP-1 oraz białka Bax.

Przedmiotem badań były komórki raka jelita grubego linii SW620.

W pierwszym etapie eksperymentu Doktorantka oznaczyła żywotność komórek testem MTT, z zastosowaniem 3mM 5-ALA i met-ALA wykazując dla dawki światła 4,5 J/cm<sup>2</sup> spadek żywotności komórek do 67% po zastosowaniu reakcji fotodynamicznej z ALA i do 59% z Met-ALA. Dla tych parametrów, stosując techniki immunocytochemiczne, Autorka określiła ekspresję białek: IGF-2, receptora dla IGF-2 (IGF-2R), IGF2-BP-1 oraz białka Bax.

W kolejnym etapie eksperymentu mgr Marta Woźniak dokonała analizy techniką Western blot lizatów komórek linii SW620, celem potwierdzenia ekspresji białka IGF-2.

Następnym krokiem Doktorantki było określenie apoptozy techniką TUNEL, która jest uznaną metodą biologii molekularnej pozwalającą na detekcję komórek apoptotycznych, a oparta jest o detekcję fragmentacji DNA. Stężenie IGF-2 mgr Marta Woźniak oznaczyła testem ELISA, wykazując znaczący wzrost stężenia oznaczanego białka po terapii fotodynamicznej. Przedstawiona powyżej metodyka pracy była jak najbardziej prawidłowa. Analizę statystyczną doktorantka wykonała wykorzystując test ANOVA. Doktorantka w przedstawionej do recenzji pracy wykazała, iż reakcja fotodynamiczna z zastosowaniem kwasu 5-aminolewulinowego powoduje wyższą immunoreaktywność IGF-2, natomiast nie zmienia ekspresji receptora IGF-2, która zarówno przed, jak i po naświetlaniu jest niska.

Doktorantka udowodniła, iż reakcja fotodynamiczna nie ma wpływu na białko wiążące IGF-2BP-1. Odnotowała istotną nadekspresję białka proapoptycznego Bax oraz wzrost liczby komórek apoptycznych. W Dyskusji autorka odniosła się do wcześniejszych swoich badań, podkreślając wpływ terapii fotodynamicznej na wydzielanie przez komórki raka białek, będących biomarkerami diagnostycznymi, a jednocześnie czynnikami wzrostu guza, takich jak NUCKS, c-Src kinazy, Ossa. Wcześniejsze obserwacje mgr Marta Woźniak uzupełniła i poparła także wynikami powyższej pracy, dotyczącymi kolejnego czynnika odgrywającego zasadniczą rolę w procesie wzrostu komórek raka i ich proliferacji, jakim jest IGF-2. Odnotowany przez doktorantkę wzrost ekspresji IGF-2 po ekspozycji na ALA PDT może być czynnikiem limitującym i osłabiającym obserwowany i spodziewany efekt cytotoksyczny terapii fotodynamicznej, jednak, co podkreśla w dyskusji Doktorantka, konieczne jest potwierdzenie obserwowanego efektu w kolejnych badaniach. Piśmiennictwo jest dobrze dobrane i liczy 26 pozycji.

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

W moim przekonaniu uzyskane rezultaty badawcze mgr Marty Woźniak są dowodem na ścisłą współpracę nauk podstawowych i świadczą o możliwościach bezpośredniego przełożenia ich wyników na badania kliniczne, co w dalszym etapie pozwoli na bezpieczne stosowanie terapii fotodynamicznej w leczeniu wybranych nowotworów jako terapii spersonalizowanej, a jednocześnie kontrolowanej poprzez oznaczenia wybranych markerów nowotworowych, w tym oznaczanych przez Autorkę Doktoratu.

W Podsumowaniu i wnioskach autorka podkreśla, iż wyniki jej doświadczeń stanowią krok w kierunku lepszego zrozumienia mechanizmów zachodzących w komórkach na poziomie białek po zastosowaniu reakcji fotodynamicznej.

Do najważniejszych osiągnięć przeprowadzonych badań Autorka zalicza:

1. Udział białka NUCKS w antyapoptycznej odpowiedzi komórkowej na stres oksydacyjny wywołany reakcją fotodynamiczną w 7 godzinie od naświetlenia;
2. Immunoreaktywność białka Ossa w 7 godzinie od reakcji fotodynamicznej, co koresponduje z najniższą w tym czasie ekspresją kinazy c-Src, co może świadczyć o ochronie antyapoptycznej komórek nowotworowych poddanych reakcji fotodynamicznej przez te białka;
3. Udowodniony wzrost IGF-2 pod wpływem reakcji fotodynamicznej w komórkach gruczolakoraka bez zmian ekspresji receptora IGF-2 oraz białka towarzyszącego IGF-2BP-1, może sugerować brak antyapoptycznej roli białka IGF-2 w komórkach nowotworowych i potwierdzać skuteczność reakcji fotodynamicznej i jej działania cytotoksycznego na komórki nowotworowe.

Przeprowadzone przez Doktorantkę eksperymenty potwierdzają działanie przeciwnowotworowe terapii fotodynamicznej, które musi jednak być poparte oznaczeniami biomarkerów, świadczących o progresji raka, wydzielanych przez komórki, które przetrwały terapię, a poprzez wydzielane czynniki wzrostu mogą decydować o progresji choroby. Idąc dalej w tych hipotezach, można zaryzykować stwierdzenie, że oznaczanie powyższych biomarkerów i znajomość oddziaływania terapii fotodynamicznej na ich wydzielanie przez komórki raka, może mieć niezwykle istotne znaczenie w doborze właściwej formy terapii w badaniach klinicznych. Znaczenie wyników powyższych badań podstawowych oceniam wysoko z punktu widzenia ich możliwości przełożenia na badania kliniczne nowych strategii leczenia onkologicznego, opartych na spersonalizowanej terapii raka, a obejmujących metody konwencjonalne, takie jak chirurgia, radioterapia i chemioterapia, które mogą zostać



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 przedstawionych do recenzji pracach opublikowanych w czasopiśmie nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka posługuje się poprawnym słownictwem, charakterystycznym dla prac naukowych, medyczny język angielski jest prawidłowy.

## **2) Ocena metodologiczna**

### **a) dobór literatury, umiejętności, wykorzystanie źródeł**

Autorka przeprowadziła dogłębne studia literaturowe, umiejętnie dobrała i wykorzystała literaturę przedmiotu. Bibliografia jest aktualna, merytorycznie ściśle związana z tematem dysertacji. Jednocześnie autorka podaje autorów, głównie obcojęzycznych, z uznanym wkładem naukowym w zakresie uprawianej dyscypliny, których dorobek jest ściśle związany z wybraną przez Doktorantkę tematem dysertacji. Pragnę jednak zwrócić uwagę na skromny udział lub brak wybranych cytacji polskich autorów z uznanym w Polsce wkładem naukowym w diagnostykę i terapię fotodynamiczną, zarówno w badaniach podstawowych, jak i klinicznych, w tym publikacji pochodzących z Zakładu Immunologii, Centrum Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie (jedna cytacja), Ośrodka Diagnostyki i Terapii Nowotworów SUM w Bytomiu (brak cytacji), czy Katedry i Zakładu Mikrobiologii i Immunologii SUM w Zabrze (brak cytacji). Ma to istotne znaczenie nie tylko dla właściwie przeprowadzonej i bogatej dyskusji przedstawionych przez Autorkę dysertacji, ale także dla podniesienia rangi polskich ośrodków badawczych i klinicznych, wnoszących istotny wkład w wiedzę i medycynę fotodynamiczną.

### **b/ Poprawność formułowania problemów i hipotez (założenia badawcze)**

W części „Cel projektu badawczego” Autorka poprawnie sformułowała założenia badawcze, podkreśliła znaczenie wyjaśnienia mechanizmów komórkowych, w których uczestniczą białka, w kontekście przeciwdziałania procesowi nowotworowemu i poszukiwaniu nowych form terapii, których przykładem jest terapia fotodynamiczna. Doktorantka w dysertacji postanowiła:

1/ dokonać wyboru białek istotnych w procesie nowotworzenia;

2/ dokonać analizy ich ekspresji po reakcji fotodynamicznej z zastosowaniem prekursora fotouczulacza - kwasu 5-aminolewulinowego;

3. określić związek przyczynowo-skutkowy zmian ekspresji białek w kontekście zastosowanej reakcji fotodynamicznej i skutków stresu oksydacyjnego, który PDT wywołuje.

**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, dokładnie przeze mnie oceniona przy omawianiu poszczególnych prac Autorki, nie budzi zastrzeżeń. Mgr Marta Woźniak wybrała właściwe metody do oznaczania biomarkerów komórek raka, właściwie zostały dobrane linie komórek raka jelita grubego linii SW620 oraz raka piersi MCF-7, które stanowią standardowy obiekt eksperymentalny, a jednocześnie dotyczą jednych z najczęściej występujących raków: raka jelita grubego i raka piersi. Doktorantka poddawała komórki 4-godzinnej inkubacji z kwasem 5-aminolewulinowym, w dalszej kolejności naświetlała z zastosowaniem lampy halogenowej (Penta Lamps, Teclas, Szwajcaria) światłem o długości fali 630+ 20nm z filtrem do całkowitej dawki światła 10J/cm<sup>2</sup> i o natężeniu światła (gęstości mocy) 60mW/cm<sup>2</sup>. Na podstawie własnych doświadczeń mogę potwierdzić, iż zarówno prekursor fotouczulacza, jak i parametry reakcji fotodynamicznej, zostały dobrze dobrane. Badania żywotności komórkowej testem MTT i apoptozy metodą TUNEL były jak najbardziej metodycznie prawidłowo wybrane i przeprowadzone. Do oznaczeń badanych białek Doktorantka wykorzystwała metodę immunocytochemii (IHC), mikrofotografie uzyskała przy użyciu Mikroskopu Olympus BX-51 wyposażonego w kamerę cyfrową, a do detekcji pojedynczych białek c-Src oraz Ossa oraz, w kolejnej pracy, białek: NUCKS, Bcl-2 oraz Bax w supernatancie komórkowym, wykorzystwała metodę Western blot, co takż opisałam i oceniłam powyżej. Stężenie białka IGF-2 Doktorantka oznaczyła metodą ELISA.

Autorka dokonała poprawnie analizy statystycznej z użyciem testu t Studenta (do porównania różnic pomiędzy średnimi grupy badanej i kontrolnej dla n=3), programu Statistica i ANOVA. Na pochwałę zasługuje przejrzysta prezentacja wyników, zobrazowanie graficzne i doskonałe 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. Rozprawa doktorska może mieć formę spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych, z ich opisem w języku polskim i angielskim (art.13, ust. 2 i 6 ustawy), i taką formę dysertacji wybrała Doktorantka.

Uwagi:

1. Dorobek Autorki jest bardzo duży. Metodyka prac i uzyskane wyniki świadczą nie tylko o ogromnej wiedzy Doktorantki, lecz również intuicji naukowej i umiejętnościach eksperymentatorskich. W aspekcie powyższych dokonań postawione przez autorkę cele, moim zdaniem, mogły zostać sformułowane śmieiej, z mniejszą ostrożnością, wynikającą najprawdopodobniej z naukowej skromności doktorantki. Wart jest podkreślenia aspekt możliwości przełożenia wyników powyższych badań komórkowych, podstawowych, na badania kliniczne i, dzięki tym „odkryciom”, udokumentowanie słuszności nowych strategii leczenia onkologicznego, opartych na terapii spersonalizowanej, w której zarówno oznaczanie biomarkerów, tak pięknie wykonane i opisane przez Doktorantkę, będące potem punktem wyjścia do immunoterapii, jak i stosowanie nowatorskiej terapii fotodynamicznej, stanowią zasadnicze jej składowe.
2. Warto także zwrócić uwagę i podkreślić fakt, że niekorzystne działanie terapii fotodynamicznej na wydzielanie wybranych białek, poprzez wywoływany stresu oksydacyjnego, ma także swoje implikacje kliniczne- umożliwia bowiem identyfikację wydzielanych czynników, poznanie ich mechanizmów działania, co w przyszłości pozwoli na rozwój nowych strategii terapeutycznych, np. dobór określonej formy immunoterapii jako metody adiuwantowej do terapii fotodynamicznej,
3. Autorka zgromadziła w pracach bogate piśmiennictwo, zgodne z tematem dysertacji, cytując liczących się w literaturze autorów, głównie obcojęzycznych, jednak mogłoby ono zostać uzupełnione poprzez bardziej liczne cytacje polskich autorów, mających niewątpliwie doniosły wkład w wiedzę fotodynamiczną.

### **3) Wniosek końcowy (konkluzja)**

Szczegółowa i wnikliwa ocena osiągnięć naukowo-badawczych mgr biologii Marty Woźniak upoważnia mnie do wyrażenia wysoce pozytywnej opinii. Moja ocena dorobku naukowego jak i cyklu prac tworzących podstawy do uzyskania stopnia doktora medycyny jest bardzo wysoka. Dojrzałość naukowa Doktorantki poparta jest zdolnością do analitycznego myślenia i trafnego wyciągania daleko idących wniosków. Rozprawa doktorska udowadnia, że mgr Marta Woźniak jest pracownikiem naukowym dojrzanym, w pełni

zdolnym do realizowania samodzielnych, twórczych koncepcji naukowych zastrzegających na stopień naukowy doktora medycyny.

Jednocześnie opiniowana dysertacja mgr Marty Woźniak 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 mgr Marty Woźniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie składam wniosek o jej wyróżnienie, z uwagi na bogaty dorobek naukowy doktorantki, wysoki poziom recenzowanej dysertacji, wysoką wartość naukową i istotny wkład uzyskanych wyników w rozwój medycyny fotodynamicznej jak i możliwość ich praktycznego zastosowania w przyszłości w terapii pacjentów onkologicznych.

Bytom, 27.06.2016

Aleksandra Kawczyk-Krupka

ADIUNKT  
Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych  
Angiologii, Medycyny Fizykanej SUM  
Dr hab. n. med. Aleksandra Kawczyk-Krupka  
Specjalista Chorób Wewnętrznych i Chorób Naczyni  
3285716