



POLITECHNIKA POZNAŃSKA

Recenzja rozprawy
Pracownik
Wydział Lekarskiego
d.s. Nauki
M. Pawłowska
prof. dr hab. Małgorzata Pawłowska



Dr hab. inż. Katarzyna Staszak

WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel.: +48 (61) 665 23 51, +48 (61) 665 23 52
e-mail: office_dctf@put.poznan.pl
www.fct.put.poznan.pl

Poznań, dn. 02.05.2023 r

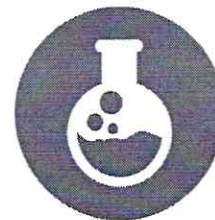
Recenzja Rozprawy doktorskiej

mgr Karoliny Matulewicz

pod tytułem *Modifications of selected cytostatics in genitourinary cancers*

Praca zrealizowana na Wydziale Lekarskim Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem dr hab. Anny Bajek, prof. UMK oraz dr. Bartosza Tylkowskiego.

Przedstawiona do recenzji Rozprawa doktorska ukierunkowana jest na poszukiwanie nowych metod leczenia nowotworów układu moczowo-płciowego, ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów pęcherza moczowego i prostaty. Celem pracy było opracowanie nowych metod wspomagających leczenie poprzez wykorzystanie biotechnologii do opracowania modyfikacji leków przeciwnowotworowych oraz zbadanie wpływu biomateriałów i substratów pochodzenia naturalnego na komórki nowotworowe w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem modeli hodowli komórkowej 2D oraz 3D. Zgodnie z założonym planem badawczym Doktorantka wykorzystwała fluorochinolony drugiej i trzeciej generacji: ciprofloksacynę oraz lewofloksacynę modyfikowane przez chitozan jako przykład biomateriału oraz naturalny ekstrakt polifenoli ze świerka pospolitego (*Picea abies*). W celu potwierdzenia potencjału tak przygotowanych materiałów wybrane zostały komercyjne linie komórkowe T24 i DU145 jako modele komórkowe i analizowano takie podstawowe parametry jak aktywność metaboliczna, tempo proliferacji, kinetyka wzrostu, poziom apoptozy, zmiany w pH medium hodowlanego oraz stosunek żywych do martwych komórek. Wyniki wykazały, że kombinacje ciprofloksacyny i ekstraktu ze świerku pospolitego (*Picea abies*) miały najbardziej toksyczne działanie na komórki nowotworowe, szczególnie w ostatnich punktach czasowych działania opracowanych w toku prac badawczych modyfikowanych leków. Z przeprowadzonych badań wynika, że modyfikowanie leków biopolimerami i ekstraktami naturalnymi może stanowić doskonały punkt wyjścia do tworzenia leków wspomagających leczenie nowotworów układu moczowo-płciowego, przy czym jak słusznie wskazała Autorka, konieczne są dalsze analizy i optymalizacje w tym zakresie. Otrzymane wyniki potwierdziły słuszność przyjętej hipotezy badawczej wskazując na możliwość wykorzystania naturalnych składników jako wsparcia



w leczeniu chorób, w tym nowotworowych. Stąd też należy stwierdzić, że mgr Karolina Matulewicz słusznie podjęła tą tematykę badawczą.

Recenzowana Rozprawa doktorska, napisana w języku angielskim, ma typowy układ. Na 184 stronach zawarte zostały streszczenie w języku polskim oraz angielskim, wstęp, cel pracy, część doświadczalna z opisem materiałów i przyjętej metodyki, wyniki badań oraz ich dyskusję. Doktorantka przedstawiła również wnioski wynikające z przeprowadzonych prac badawczych oraz wykaz skrótów i symboli stosowanych w pracy, spis rycin i tabel, bibliografię, w postaci 169 odnośników literaturowych, oraz załącznik zawierający zgodę komisji bioetycznej.

We wstępie Doktorantka przedstawia informację na temat konieczności podjęcia tematyki badawczej, poprzez wskazanie problemu wzrostu zachorowalności na nowotwory ze szczególnym uwzględnieniem przypadków raka pęcherza moczowego oraz prostaty. Ponadto w pracy omówiono zastosowanie biopolimerów w systemach dostarczania leków ze względu na ich niską toksyczność, biodegradowalność, stabilność i odnawialność. Skupiono się na chitozanie, szeroko stosowanym biopolimerze w dostarczaniu leków, który ma unikalne właściwości jako nośnik, może przedłużyć czas przebywania i zwiększyć absorpcję leków. We wstępie omówiono również zastosowanie chemoprewencji i związków naturalnych w leczeniu nowotworów, z naciskiem na polifenole i flawonoidy, które są związkami wtórnego metabolizmu roślin, posiadającymi szerokie spektrum aktywności farmakologicznej, w tym udokumentowane właściwości przeciwnowotworowe. Związki te wykazują skuteczność w zaburzaniu inicjacji, promocji i progresji nowotworów. W tym miejscu mgr Karolina Matulewicz zwróciła uwagę na potencjalne źródła pozyskiwania związków bioaktywnych z odpadowych choinek świątecznych pochodzących ze świerku norweskiego, co wpisuje się w obserwowane w ostatnich latach trendy gospodarki o obiegu zamkniętym, który ma na celu zminimalizowanie powstawania odpadów i znalezienie rozwiązań na ich ponowne wykorzystanie. Jednocześnie w sposób skrótowy przedstawiono informację dotyczące stosowanych w pracy leków, to jest ciprofloksacyny oraz lewofloksacyny. Doktorantka wskazała również zalety stosowania modeli trójwymiarowych w ocenie *in vitro* w stosunku do tradycyjnych modeli 2D, dzięki naśladowaniu charakterystyki organów, co stanowi o nowym podejściu do oceny diagnostycznej i terapeutycznej.



Pomimo, że wstęp prawidłowo przedstawia główne założenia pracy, jego lektura wskazała na pewne niedociągnięcia. Doktorantka w pracy wspomina o potencjale ciprofloksacyny i lewofloksacyny w leczeniu nowotworów, ale nie omawia żadnych potencjalnych wad lub skutków ubocznych tych leków. Zapewnienie bardziej zrównoważonej dyskusji na temat korzyści i zagrożeń sprawiłoby, że wprowadzenie byłoby bardziej informacyjne i wskazałoby podstawy do wybrania tych leków do dalszych badań w ramach realizacji pracy doktorskiej. Ponadto brakuje szczegółowych danych na temat rodzajów nowotworów, wobec których wykazano skuteczność ciprofloksacyny i lewofloksacyny. Przedstawienie tych informacji wskazałoby na potencjalne znaczenie kliniczne tych leków, a w konsekwencji na potencjał prowadzonych prac badawczych w ramach realizacji rozprawy doktorskiej. W mojej opinii również podrozdział dotyczący modeli hodowli komórkowych 3D („*In vitro studies - barriers and opportunities for development*”) powinien być doprecyzowany, aby zapewnić bardziej konkretne przykłady i szczegóły dotyczące zalet i ograniczeń różnych typów modeli 3D. Pomogłoby to lepiej zrozumieć obecny stan dziedziny w tym zakresie i potencjalne implikacje stosowania modeli 3D do badania i rozwoju leków, jak również podkreśliło nowatorski charakter pracy.

W recenzowanej Rozprawie doktorskiej, w drugim rozdziale („*Aim of the study*”) mgr Karolina Matulewicz przedstawiła pięć głównych celów związanych z realizacją prowadzonych prac badawczych: potwierdzenie skuteczności komercyjnych leków: ciprofloksacyny oraz lewofloksacyny w leczeniu nowotworów układu moczowo-płciowego, ocenę cytotoksycznego działania naturalnych ekstraktów ze świerku pospolitego *Picea abies* na komórki nowotworowe i porównanie go z działaniem wybranych leków w połączeniu z ekstraktem, ocenę wpływu biopolimeru chitozanu na komórki nowotworowe i porównanie go z działaniem wybranych leków w połączeniu z biopolimerem, optymalizację metody tworzenia sferoidów komórkowych oraz porównanie czułości modeli komórkowych 2D i 3D w podstawowych badaniach cytotoksycznych.

W kolejnym rozdziale dysertacji, „*Material and methods*”, Doktorantka opisała metodykę prowadzenia prac badawczych. W pracy przedstawiono wykorzystane linie komórkowe, metody ich hodowli i pasażowania oraz techniki oceny żywotności komórkowej oraz tworzenia wielokomórkowych sferoidów nowotworowych przy użyciu magnetycznej metody druku 3D. Autorka opisała również stosowaną procedurę

52



modyfikacji komercyjnych leków z zastosowaniem propanowych naturalnych składników wraz z oceną ich działania terapeutycznego.

Analiza tego rozdziału Rozprawy doktorskiej, w mojej opinii, wskazuje, że mgr Karolina Matulewicz powinna w sposób bardziej szczegółowy opisać przyjętą metodykę prowadzenia prac badawczych. Przykładowo, w podrozdziale dotyczącym uczenia maszynowego („*Imaging technique and training a neural network*”) Autorka opisuje zastosowanie klasyfikatora opartego na sieci neuronowej do analizy kinetyki wzrostu komórek. Chociaż metodologia wydaje się dobrze zaprojektowana i dokładna, istnieją pewne potencjalne zastrzeżenia, które można wysunąć. Po pierwsze, ten fragment pracy nie dostarcza żadnych informacji na temat tego, jak zostały wybrane obrazy lub jak bardzo są one reprezentatywne dla całego zbioru danych. Jest to ważne, ponieważ dokładność sieci neuronowej w dużym stopniu zależy od jakości i różnorodności danych treningowych. Nie jest również jasne, czy zbiór danych był zrównoważony pod względem liczby obrazów na klasę (tło, komórki, komórki w procesie podziału). Jest to bardzo istotna kwestia, ponieważ niezrównoważone zestawy danych mogą prowadzić do stronniczych klasyfikatorów. Po drugie, chociaż wskazany fragment wspomina, że baza danych treningowych zawierała ponad 100 zdjęć komórek wykonanych na różnych etapach proliferacji, nie jest jasne, ile z nich zostało wykorzystanych do treningu, a ile do walidacji sieci neuronowej. Ważne jest, aby mieć oddzielny zestaw walidacyjny, aby upewnić się, że sieć neuronowa nie jest nadmiernie dopasowana do danych treningowych i może dobrze generalizować na nowe obrazy. Wreszcie, w pracy stwierdzono, że szkolenie sieci zostało przeprowadzone przy użyciu akceleracji sprzętowej (GPU Quadro p2200) i zajęło co najmniej 100 000 iteracji aż do osiągnięcia ponad 97% sukcesu. Definicja „sukcesu” (ang. *success*) nie jest jednak jasna. Nie wspomniano też, czy zastosowano jakieś techniki regularyzacji, aby zapobiec przeuczeniu. Bez tych szczegółowych danych trudno jest ocenić solidność i generalizację wytrenowanej sieci neuronowej.

Kolejną kwestią wymagającą doprecyzowania jest opis pomiaru sferoid komórkowych do szacowania kinetyki. W recenzowanej Rozprawie doktorskiej zaznaczono, że powierzchnia sferoidów w użytym kontekście odnosi się do dwuwymiarowego rozmiaru sferoidów obserwowanego i mierzonego na obrazach jasnego pola rejestrowanych w dniach 0-6 przy użyciu mikroskopu odwróconego. Natomiast analizę morfometryczną sferoid i pomiar ich powierzchni przeprowadzono przy użyciu komercyjnego oprogramowania EPview 1.3, co pozwoliło na określenie wielkości sferoid w różnych punktach czasowych



w okresie wzrostu. Powierzchnia sferoidów może być wykorzystana jako zastępczy wskaźnik ich objętości, ponieważ założono, że sferoidy zachowują względnie jednolity kształt i gęstość przez cały okres wzrostu. Niemniej jednak korzystanie z pomiarów powierzchni sferoidów, jako wskaźnika zastępczego dla ich objętości, może prowadzić do niedokładności w szacowaniu rzeczywistej objętości sferoidów. Wynika to z faktu, że sferoidy mogą nie być idealnie kuliste, co może skutkować różnicą między ich rzeczywistą objętością a objętością oszacowaną na podstawie ich powierzchni. Jest to także widoczne w prezentowanych wynikach (np. rysunek 66 na str. 117), gdzie komórki raka prostaty nie zawsze tworzą poprawne sferoidy. Ponadto, zmiany kształtu sferoidy w czasie (takie jak spłaszczenie lub nieregularności powierzchni) mogą nie zostać uchwycone przez sam pomiar powierzchni. Czy wykorzystana w pracy umowna powierzchnia może stanowić duże źródło błędów?

W mojej opinii mgr Karolina Matulewicz powinna również ustosunkować się do kwestii analizy obrazów martwych i żywych komórek (podrozdział 3.12 „Live/Dead Assay”). Wspomniana w Rozprawie doktorskiej ręczna metoda progowa (*manual threshold*) jest podejściem półautomatycznym, które opiera się na subiektywnej ocenie osoby obsługującej urządzenie w celu określenia wartości progowej dla segmentacji obrazu. Takie podejście może być podatne na błędy i niespójności, między innymi, pomiędzy różnymi osobami oceniającymi uzyskane doświadczalnie obrazy. Tym samym opis metody przedstawiony w tym fragmencie Rozprawy doktorskiej jest ograniczony i brakuje w nim ważnych szczegółów, takich jak kryteria wyboru wartości progowej oraz wskazania jakie środki zostały podjęte w celu zapewnienia spójności w przypadku powtórzenia eksperymentu przez inną osobę. Ponadto wydaje się, po lekturze dysertacji, że proponowana metoda nie obejmuje żadnych procedur kontroli jakości lub walidacji w celu oceny dokładności i wiarygodności wyników.

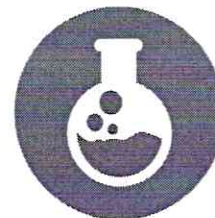
Rozdział czwarty recenzowanej Rozprawy doktorskiej („Results”) poświęcony jest opisowi wyników badań uzyskanych w toku realizacji prac badawczych. Autorka opisuje uzyskane wyniki modyfikacji leków za pomocą zaproponowanych naturalnych modyfikatorów, czyli chitosanu oraz ekstraktu ze świerku pospolitego. Rozdział ten napisany jest w klasycznym układzie, poprzez szczegółowe opisanie kolejnych etapów badań, takich jak charakterystyka związków biologicznie aktywnych, ocena żywotności komórek, apoptozy oraz proliferacji komórek. Przy czym należy zaznaczyć, że pomimo tego, że opis zmian morfologicznych obserwowanych w komórkach po leczeniu z zastosowaniem komercyjnych leków oraz po



ich modyfikacji, jest dobrze przedstawiony, istnieje jednak kilka potencjalnych obszarów wymagających wyjaśnienia:

- Opis zmian w morfologii komórek jest nieco ogólny i brakuje w nim konkretnych szczegółów. Na przykład, pomocne byłoby poznanie stopnia zmniejszania się komórek, liczby komórek, które utraciły kontakt komórka-komórka oraz zakresu zaobserwowanego zaokrąglenia się kształtu komórek. Bez tych precyzyjnych informacji trudno jest w pełni zrozumieć wpływ leczenia farmakologicznego na morfologię komórek. Na korzyść wpływa tu jednak przedstawienie w Rozprawie doktorskiej przykładowych fotografii uzyskanych w trakcie prowadzenia prac badawczych.
- W badaniu po leczeniu wybranymi lekami lub ich modyfikowanymi wersjami obserwowano komórki tylko w jednym punkcie czasowym (72 godziny). Dobrze byłoby zobaczyć, jak morfologia zmienia się w czasie, ponieważ mogłoby to dostarczyć wglądu w mechanizm działania leków oraz informacji jak komórki na nie reagują.
- Chociaż w Rozprawie doktorskiej Autorka wspomina o zastosowaniu analizy morfometrycznej, nie podano konkretnej kwantyfikacji zmian obserwowanych w obszarze lub kształcie komórek. Ogranicza to możliwość wyciągnięcia znaczących wniosków na temat wpływu leczenia lekami na morfologię komórek.
- Badanie opisuje zmiany morfologiczne obserwowane przy zastosowaniu różnych leków bądź ich modyfikacji z zastosowaniem chitozanu i ekstraktu ze świerku pospolitego, ale nie porównuje bezpośrednio wpływu leków na morfologię komórek. Bezpośrednie porównania mogłyby pomóc w wyjaśnieniu specyficznych efektów każdego z leków i zidentyfikowaniu potencjalnych różnic w mechanizmie działania.

W mojej opinii doprecyzowania wymaga również rozdział dotyczący ocena żywych sferoid - test WST8 i MTT zamieszczony na str. 120-121 Rozprawy doktorskiej. Podczas gdy spadek żywotności w linii komórkowej DU145 został odnotowany jako statystycznie istotny, użyteczne byłoby poznanie wielkości tej różnicy i tego, czy jest ona biologicznie istotna. Wreszcie, przydatne byłoby poznanie przesłanek wyboru sferoidów

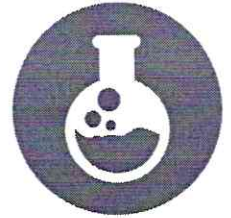


wykonanych z linii komórkowej T24 do dalszych badań, ponieważ informacja ta nie została podana w tej części pracy.

Jednocześnie Autorka powinna się ustosunkować do zaniechania części badań związanych z analizą kinetyki wzrostu sferoidów wielokomórkowych. Przebiegi dla stężenia obu leków 1000 mikromoli/litr (rysunki 78 i 80) wykazują charakterystyczne załamanie. Wydaje się to racjonalne, natomiast dlaczego nie sprawdzono czy a jeśli tak to o ile później, efekt taki mógłby nastąpić dla mniejszych stężeń? Tym bardziej, że późniejsza modyfikacja ekstraktem z igieł świerku, przedstawiona na str. 147 Rozprawy doktorskiej, wyraźnie pokazała, że dla niższych stężeń też taki efekt może występować.

W tym miejscu warto również zwrócić uwagę na kwestię prezentacji wyników badań. Przykładowo, rysunki 68 A i B mają zastosowaną zbyt szeroką skalę co zaciemnia przedstawioną informację graficzną. Ponadto w części tej pomyłono numerację rysunków, do których odwołano się w tekście jako do rysunków 70 A i B, a faktycznie mają one numerację, odpowiednio 68 A i B. W opisach rysunków występuje niewłaściwa numeracja a w tekście błędne odnośniki. Niestety błąd ten propaguje się na dalsze części recenzowanej Rozprawy doktorskiej. Jednocześnie forma graficzną prezentacji wyników badań w kontekście prowadzenia linii pomiędzy punktami doświadczalnymi wymaga komentarza. Z punktu widzenia analizy wyników badań taka reprezentacja wyników nie zawsze jest uzasadniona. Przykładowo Autorka na rysunku 66 (str. 119) zaproponowała funkcję dopasowującą do punktów doświadczalnych. Niestety wykorzystanie funkcji sklepanej generuje ekstrema, szczególnie dla danych dla 10 000 komórek, które nie są tłumaczone przez punkty pomiarowe.

W rozdziale piątym „Discussion” Doktorantka poprawnie wskazała, że przeprowadzone na liniach komórkowych nowotworowych układu moczowo-płciowego badania potwierdziły cytotoksyczne działanie fluorochinolonów takich jak ciprofloksacyna i lewofloksacyna oraz wykazały, że modyfikacja tych leków chitozaniem i wyciągiem z igieł świerka psopolitego *Picea abies* może znacząco zwiększyć ich potencjał cytotoksyczny. W ramach przeprowadzonej dyskusji Autorka odwołała się do szeregu prac innych autorów wskazując, że trend nano- i biotechnologii jest obiecującym kierunkiem badawczym w dziedzinie w rozwoju nowych systemów dostarczania leków. Należy zwrócić tutaj uwagę na pewne błędy edycyjne. W podsumowaniu Autorka odnosi się do pozycji Madhu L., która nie istnieje w spisie literatury. Pozycja podana jako 163. Podobnie pozycja Mahsid G. przytoczona z numerem 158.



Dr hab. inż. Katarzyna Staszak

WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel.: +48 (61) 665 23 51, +48 (61) 665 23 52
e-mail: office_dctf@put.poznan.pl
www.fct.put.poznan.pl

Ostatni rozdział Rozprawy doktorskiej zawiera zwięzłe przedstawienie najważniejszych wniosków uzyskanych w toku realizacji prac badawczych, które potwierdzają osiągnięcie założonych celów.

Podsumowując, tematyka Rozprawy doktorskiej dotyczy ważnego i bardzo aktualnego trendu w naukach medycznych poświęconego poszukiwaniem nowych leków, w tym również poprzez ich modyfikację opartą o materiały pochodzenia naturalnego. Należy podkreślić duży nakład pracy Doktorantki w celu zrealizowania postawionych celów badawczych oraz duże walory poznawcze przedstawionej dysertacji. W mojej opinii przedstawiona do recenzji Rozprawa doktorska, pomimo sformułowanych uwag, spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez obowiązujące ustawowe przepisy. W związku z powyższym wnoszę zatem do rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Karoliny Matulewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

dr hab. inż. Katarzyna Staszak