

Kraków, 4 maja 2023

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Matulewicz

pt. „Modifications of selected cytostatics in genitourinary cancers”

wykonanej w Uniwersytecie Mikołaja Kopernia w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwiga Rydygiera w Bydgoszczy .

*Podstawa formalną wykonania recenzji stanowi pismo Ladd.5201.1598.2023 – Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu z 10 marca 2023 roku.*

### 1. Formalna ocena układu rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Karoliny Matulewicz jest napisana w języku angielsku i liczy 184 strony. Rozprawa ma typowy układ dla tego typu opracowań, tj. składa się z następujących rozdziałów: Wstępu poprzedzonego streszczeniami w języku angielski i polskim, Celu pracy, Materiałów i metod, Wyników, Dyskusji i Wniosków. Załączniki do pracy stanowią Zgoda Komisji Bioetycznej, Wykaz stosowanych skrótów oraz Spisy tabel i wykresów. Dysertacja jest zakończona spisem piśmiennictwa, obejmującym 169 pozycji. Praca została przygotowana zgodnie z normami przyjętymi dla tego typu opracowań, choć warto zwrócić uwagę, że rozprawa doktorska p. Matulewicz jest wykonana w oparciu o komercyjnie dostępne linie komórkowe. Zamieszczanie zatem Zgody Komisji Bioetycznej nie dotyczy badań prezentowanych w rozprawie, a jak rozumiem dalszych prób zastosowania modyfikacji testowanych leków w leczeniu chorych na nowotwory pęcherza i prostaty.

Narodowy Instytut Onkologii  
im. Marii Skłodowskiej-Curie  
- Państwowy Instytut Badawczy  
Oddział w Krakowie  
ul. Garncarska 11  
31-115 Kraków

Dyrekcja  
Tel.: +48 12 634 82 00  
Fax: +48 12 422 66 80  
  
dyrektor@onkologia.krakow.pl  
www.onkologia.krakow.pl

Centrala  
Tel.: +48 12 634 80 00  
Fax: +48 12 423 10 76  
  
NIP: 5250008057  
REGON: 000288366-0035

## 2. Merytoryczna ocena pracy

Celem recenzowanej pracy było poszukiwanie w badaniach *in vitro* nowych metod leczenia nowotworów układu moczowo-płciowego, związanych z modyfikacją fluorochinolonów drugiej i trzeciej generacji: ciprofloksacyny i lewofloksacyny. Modyfikacje te polegały na zastosowaniu biodegradowalnego biopolimeru chitozanu jako związku bioadhezyjnego, zwiększającego wnikanie leków do komórek nowotworowych oraz dodanie do wymienianych wyżej fluorochinolonów ekstraktu ze świerka pospolitego (*Picea abies*), zawierającego duże ilości związków przeciwutleniających – flawonoidów. Kolejnym celem pracy było porównanie działania testowanych leków i ich modyfikacji w komórkowych hodowlach 2D i 3D. Praca doktorska p. Matulewicz wpisuje się zatem w bardzo aktualne kierunki badań nad opracowaniem nowych strategii leczenia chorych na nowotwory złośliwe. Z jednej strony zarówno w odniesieniu do raka pęcherza, jak i raka prostaty wciąż konieczne są poszukiwania skuteczniejszych i bezpieczniejszych terapii. Rak pęcherza moczowego jest drugim, najczęściej diagnozowanym nowotworem układu moczowo-płciowego w Europie, a w Polsce w 2020 roku według Krajowego Rejestru Nowotworów (KRN) odnotowano ponad 4 800 zachorowań na raka pęcherza i ok. 3 200 zgonów z jego powodu. Nowotwór ten charakteryzuje się bardzo częstymi nawrotami oraz dużym ryzykiem progresji. W okresie 5 lat po wykonaniu przezcewkowej resekcji guza pęcherza moczowego nawroty choroby odnotowuje się u 50-70% chorych. Często obserwuje się też liczne działania niepożądane podczas leczenia standardową chemioterapią. Rak gruczołu krokowego, z kolei zajmuje w Polsce pierwsze miejsce u mężczyzn pod względem częstości zachorowania z liczbą zachorowań i zgonów w 2020 roku na poziomie ponad 14 000 i 5 700. Choć rokowania w przypadku nowotworu organicznego do gruczołu krokowego są dobre i pięcioletnie przeżycie chorych w przypadku stadium miejscowego wynosi 100%, to w przypadku stadium uogólnionego, czyli choroby rozsianej przeżycie to szacowane jest na ok. 30%. Biorąc pod uwagę powyższe statystyki, opracowanie skutecznych metod leczenia przeciwnowotworowego chorych na raka pęcherza moczowego i gruczołu krokowego pozostaje w dalszym ciągu niezaspokojoną potrzebą medyczną i sprawia, że podjęty przez Doktorantkę temat posiada duże znaczenie kliniczne i społeczne. Z drugiej strony w piśmiennictwie światowym zwraca się obecnie uwagę na kluczowe znaczenie zastosowania w badaniach przedklinicznych dotyczących skuteczności potencjalnych leków przeciwnowotworowych bardziej wiarygodnych, niż hodowle 2D, modeli badań. Modele te są niezbędne do rozszyfrowania kluczowych mechanizmów molekularnych w procesach decydujących o wzroście guza, potencjale do przerzutowania, lekooporności i unikaniu przez komórki nowotworowe nadzoru układu immunologicznego. Jednym z takich modeli mogą być hodowle



3D nowotworowych linii komórkowych, a wśród nich sferoidy, stanowiące agregaty komórek nowotworowych. Wielokomórkowe sferoidy nowotworowe wykazują cechy guza wzrastającego w warunkach *in vivo* we wczesnej fazie jego wzrostu i dlatego uważane są za formę pośrednią pomiędzy komórkami z hodowli typu jednowarstwowego a guzem wzrastającym spontanicznie. Zastosowanie hodowli 3D w badaniach nad skutecznością modyfikacji badanych przez Doktorantkę leków o potencjale przeciwnowotworowym dowodzi bardzo dobrej znajomości obecnych trendów dotyczących wyboru modeli w badaniach przedklinicznych i wpisuje się w zalecenia WHO, dotyczące poszanowania praw zwierząt w badaniach przedklinicznych. W powyższe zagadnienia wprowadza czytelnika rozprawy Wstęp, który liczy 12 stron. W rozdziale tym Doktorantka poruszyła takie tematy jak: wzrastająca zachorowalność na nowotwory złośliwe, w tym w szczególności na raka pęcherza moczowego i raka prostaty, biopolimery, chemoprewencja, biologiczna aktywność polifenoli, flawonoidów, ekstraktu ze świerka pospolitego oraz ciprofloksacyliny i lewofloksacyliny. Dane w tym rozdziale są przedstawione w sposób zwięzły i zrozumiały. Uważam jednak, że w odniesieniu do danych epidemiologicznych Autorka powinna zacytować polskie podsumowania i że dość pobieżnie jest także poruszony temat chemoprewencji. Doktorantka wymienia tylko niektóre przykłady związków o potencjale chemoprewencyjnym i nie tłumaczy dlaczego zdecydowała wymienić tylko te występujące w niektórych warzywach i owocach.

W kolejnym rozdziale Doktorantka bardzo konkretnie formułuje 5 celów pracy, które znajdują umocowanie w poprzedzającym teoretycznym wstępie.

Kolejny rozdział pracy jest poświęcony materiałom i metodom, opisanym na 12 stronach pracy. Na początku tego rozdziału zabrakło mi jednak uzasadnienia, dlaczego Doktorantka zdecydowała się na badania linii komórkowych raka pęcherza T24 i raka gruczołu krokowego DU145. Jest to o tyle istotne zagadnienie, że nie każda linia komórkowa wykazuje wymaganą wydajność lub stabilność tworzenia sferoidów w hodowli 3D. Bardzo proszę zatem, aby Doktorantka ustosunkowała się do tego w trakcie obrony pracy doktorskiej. Proszę także o podanie informacji, który pasaż badanych komórek stosowała w swoich analizach. Na podkreślenie natomiast zasługuje szeroki panel testów, które Doktorantka zastosowała w przeprowadzonych badaniach, takich jak: testy żywotności MTT i WSTB, testy poziomu apoptozy, proliferacji komórek i analiza pH pożywek w których hodowano komórki. Zastosowanie tak urozmaicanych i wzajemnie komplementarnych testów bardzo dobrze świadczy o warsztacie badawczym Doktorantki. Wszystkie eksperymenty zostały wykonane w trzech niezależnych powtórzeniach.

Kolejny rozdział pracy, liczący 110 stron, opisuje uzyskane wyniki. Rozdział ten zaczyna się od przedstawienia wpływu modyfikacji chitozanem badanych leków na wyniki wyżej wy-

mienionych testów w komórkach hodowanych w warunkach 2D. Z przedstawionych danych wynika, że modyfikacja chitozanem skutkowała zwiększeniem cytotoksyczności ciprofloksacyny i lewofloksacyny. W następnych częściach tego rozdziału Doktorantka dowiodła, że modyfikacja fluorochinolonów przez jednoczesną inkubację kultur adherentnych z ekstraktem ze świerku popolitego spowodowała większą cytotoksyczność w porównaniu do niemodyfikowanych fluorochinolonów. Podobne doświadczenia wykonane w hodowli 3D ujawniły, z kolei, większą czułość wielokomórkowych sferoidów niż w komórek hodowanych w 2D na działaniu badanych leków i ich modyfikacji. Należy przyznać, że Doktorantka bardzo logicznie i konsekwentnie przeprowadza czytelnika przez opis uzyskanych wyników, a wyniki badań są udokumentowane licznymi mikrofotografiami.

Dyskusja otrzymanych wyników zajmuje 10 stron i koncentruje się na trzech zagadnieniach: znaczeniu chitozanu jako polimeru mogącego wpływać na cytotoksyczność leku, zastosowaniu ciprofloksacyny i lewofloksacyny i ich modyfikacji jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych oraz wprowadzeniu nowych modeli do badania potencjału cytotoksycznego w badaniach przedklinicznych. Dyskusja przeprowadzona jest rzeczowo i bardzo logicznie w oparciu o najnowsze dane literaturowe. Na koniec tego rozdziału Doktorantka nakreśliła dalsze plany badawcze związane z otrzymanymi wynikami, zarówno w odniesieniu do modyfikacji leków przeciwnowotworowych, jak i rozwoju modelu 3D opartego na wielokomórkowych sferoidach, co bardzo dobrze świadczy o dojrzałości naukowej mgr Matulewicz i gotowości do podjęcia dalszych wyzwań naukowych. Szkoda jednak, że w dyskusji Doktorantka jednoznacznie nie wskazała elementów nowości uzyskanych wyników.

Autorka kończy rozprawę sformułowaniem 6 wniosków, które są w pełni uprawnione w świetle otrzymanych wyników. Niektóre z wniosków należałoby jednak przedstawić z większą przejrzystością i jednoznacznością, np. wniosek nr 6, w którym Doktorantka powinna jednoznacznie stwierdzić, w odniesieniu do jakiego modelu wykazała większa czułość wielokomórkowych sferoidów w badaniach nad cytotoksycznością potencjalnych leków przeciwnowotworowych.

W swojej rozprawie doktorskiej Autorka cytuje 169 pozycji piśmiennictwa z lat 1987-2023, można zatem być pewnym, że mgr Matulewicz ma szeroką wiedzę z zakresu poruszanej tematyki w swojej rozprawie doktorskiej. Sposób cytowania literatury należałoby jednak ujednoczyć, ponieważ pod tym względem występują liczne rozbieżności.

Pod względem edytorskim praca jest przygotowana bardzo starannie, jednak Doktorantka nie ustrzegła się kilku błędów, które utrudniają lekturę pracy. W rozdziale dotyczącym wyników numeracja rozdziałów i podrozdziałów, począwszy od podrozdziału 4.4.2 jest błędna. W opisie



wyników, począwszy od strony 119 do końca tego rozdziału, występuje także niewłaściwa numeracja wykresów, a rycina 16 posiada błędny podpis, ponieważ dotyczy ona ciprofloksacyny, a nie jak podaje Autorka lewofloksacyny.

Podsumowując pragnę jednak podkreślić, że w moim przekonaniu mgr Matulewicz uzyskała wartościowe wyniki, które są podstawą do podjęcia dalszych badań nad modyfikacją leków przeciwnowotworowych, jak i rozwoju modelu 3D, opartego na wielokomórkowych sferoidach, mogącego znaleźć zastosowanie w badaniach przedklinicznych. Stwierdzam zatem, że przedstawiona praca spełnia w pełni wymogi rozprawy doktorskiej określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę zatem o dopuszczenie mgr Karoliny Matulewicz przez Wysoką Radę Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Beata Imięćka

