



PAN - Instytut Immunologii	
Wpł. dnia	05.10.2018
L. dz.	451/2018

UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra Onkologii

Klinika Onkologii Ginekologicznej

dr hab. Jolanta Szelachowska

Kierownik

Wrocław, 22.09.2018r.

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

magister Ksenii Porshnevej pt.:

„Clopidogrel oraz donory NO i CO: badanie ich wpływu na oddziaływanie pomiędzy płytkami krwi, śródbłonkiem a komórkami nowotworowymi”

Niniejszym wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda o wyróżnienie przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej pani magister Ksenii Porshnevej. pt. „Clopidogrel oraz donory NO i CO: badanie ich wpływu na oddziaływanie pomiędzy płytkami krwi, śródbłonkiem a komórkami nowotworowymi”

Praca ta wyróżnia się oryginalnością zastosowanych metod badawczych, posiada szczególne walory poznawcze i użytkowe. Ponadto dostarcza rzetelnej odpowiedzi na pytania dotyczące wpływu donorów CO i NO oraz leku przeciwplatekowego na proces przerzutowania komórek raka piersi.

Moim zdaniem przedstawiona dysertacja zasługuje na wyróżnienie z uwagi na wagę poruszonego tematu, szeroki panel badań przeprowadzonych przez Doktorantkę, oraz wysoką rzetelność i wiarygodność otrzymanych wyników. Dodatkowo bardzo istotne i ciekawe są implikacje kliniczne uzyskanych wyników.

Przedstawioną mi do recenzji pracę wyróżnia unikalna tematyka, rzetelne i czytelne przedstawienie wyników badań i potencjalna możliwość praktycznego zastosowania uzyskanych rezultatów. Powyższe cechy pracy czynią ją, w mojej ocenie, ponadprzeciętną i zasługującą na wyróżnienie.

Zapoznawszy się dokładnie z treścią ocenianej pracy doktorskiej stwierdzam, że zarówno rzetelne przedstawienie wyników badań jak i potencjalna możliwość praktycznego ich wykorzystania, wyrażnie przewyższa przeciętne wymagania stawiane pracom doktorskim. Praca zasługuje na wyróżnienie.

Z wyrazami szacunku

Jolanta Szelachowska



UNIWERSYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra Onkologii

Klinika Onkologii Ginekologicznej

dr hab. Jolanta Szelachowska

Kierownik

Wrocław, 20 września 2018 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

mgr Ksenii Porshnevej pt.:

Clopidogrel oraz donory NO i CO: badanie ich wpływu na oddziaływanie pomiędzy płytkami krwi, śródbłonkiem a komórkami nowotworowymi

Podstawową cechą odróżniającą nowotwory złośliwe od guzów łagodnych jest ich zdolność do tworzenia przerzutów odległych. Pojawienie się przerzutów jest jednym z najistotniejszych czynników prognostycznych u chorych onkologicznych.

W ujęciu klinicznym to właśnie ujawnienie się rozsiewu na bardzo wczesnym etapie choroby świadczy o agresywności nowotworu. W większości przypadków (ponad 80%) to rozsiew choroby nowotworowej, a nie ognisko pierwotne, prowadzi do zgonu pacjenta. Dlatego punktem zwrotnym w progresji guza jest nabycie przez jego komórki zdolności do przerzutowania.

Tworzenie przerzutów to złożony i wieloetapowy proces, podczas którego komórki nowotworowe opuszczają swoje ognisko pierwotne i migrują do innych części organizmu poprzez krew i chłonkę. Mechanizm przerzutowania nie należy do najsprawniej działających. Powszechnie przyjmuje się że tylko około 0,1% komórek, które dostały się do krążenia, jest w stanie przeżyć i dać początek wtórnym ogniskom choroby. Za taki stan rzeczy odpowiada między innymi fakt, iż po przedostaniu się do światła naczyń krążące komórki nowotworowe (CTC) są narażone na działanie układu odpornościowego gospodarza więc pojedyncze CTC

z reguły są likwidowane. CTC mają jednak tendencje do tworzenia skupisk komórkowych, które mają większe szanse na przeżycie i utworzenie przerzutów. Takie zlepy komórkowe powstają na zasadzie adhezji i tworzone są z innymi komórkami nowotworowymi lub prawidłowymi – głównie płytkami krwi. Strategia ta jest skuteczną metodą na unikanie mechanizmów niszczenia komórek nowotworu przez układ odpornościowy, co szczególnie w przypadku opłaszczania przez trombocyty, zwiększa szanse CTC na wyłamanie się spod kontroli immunologicznej gospodarza.

Powodzenie w tworzeniu przerzutów i przenikaniu z przestrzeni wewnątrznaczyniowej do tkanek narządów docelowych zależy również od specyficznych interakcji pomiędzy powierzchnią krążących komórek nowotworowych a śródbłonką naczyń krwionośnych.

W swoim badaniu Doktorantka podejmuje się heroicznego wysiłku zbadania wpływu wybranych przez siebie substancji, o potencjalnych właściwościach naczyńioprotekcyjnych i przeciwplatekcyjnych, na mechanizm przerzutowania. Wyniki tego typu badań pozwalają wyjaśnić lub choćby przybliżyć, jakie oddziaływania zachodzą na tym etapie progresji nowotworu. Co prawda badania te przeprowadzane są na modelach mysich co nie przekłada się bezpośrednio na klinikę ludzkich nowotworów, ale stanowi niezwykle cenny przyczynek do dalszych badań i mają istotne znaczenie dla opracowywania skutecznych strategii terapeutycznych.

Niestety, jak powszechnie wiadomo, pomimo że obecnie stosowane strategie leczenia onkologicznego w istotny sposób wydłużyły przeżycie pacjentów, do tej pory nie udało się opracować metody która całkowicie zahamowałaby tworzenie się przerzutów.

Przedstawiona do recenzji dysertacja liczy 150 stron i ma klasyczny układ opracowań naukowych. Zawiera siedem rozdziałów, skorowidz skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Piśmiennictwo jest odpowiednio dobrane i cytowane. Tekst zilustrowany jest trzydziestoma sześcioma rycinami i czternastoma tabelami, które są doskonałej jakości i znakomicie ilustrują wyniki. Część graficzna pracy przygotowana jest znakomicie.

Wstęp, liczący 27 stron, napisany jest przejrzysto i stanowi syntezę najnowszych poglądów dotyczących powstawania przerzutów nowotworowych. Szczególne miejsce w tej części publikacji autorka poświęca roli płytek krwi i komórek śródbłonki w tworzeniu się ognisk metastatycznych oraz potencjalnego wykorzystania donorów NO, CO oraz Clopidogrelu w hamowaniu tego procesu. Biorąc pod uwagę mnogość publikacji naukowych dotyczących tych tematów należy podkreślić doskonałą umiejętność Doktorantki do zwięzłego korzystania z piśmiennictwa.

Lektura wstępu merytorycznie przybliża nas do **celu pracy**, który został jednoznacznie i rzeczowo sprecyzowany w 5 punktach. Głównym celem pracy było: Zbadanie aktywności przeciwprzerzutowej donorów NO i CO oraz Clopidogrelu stosowanych samodzielnie lub w kombinacji. Określenie najbardziej aktywnych schematów leczenia i dawek stosowanych substancji. Ustalenie mechanizmu działania przeciwprzerzutowego

badanych substancji, poprzez ocenę adhezji komórkowej i migracji. Ponadto zbadanie aktywności przeciwegregacyjnej i przeciwpłytkowej donorów CO i NO.

Rozdział dotyczący **materiału i metod** zajmuje 23 strony i szczegółowo, krok po kroku, przedstawia realizację przeprowadzonego badania. Niezwykle rzetelnie zostały omówione linie komórkowe, badane zwierzęta i zastosowane na nich testy, techniki badań, schematy postępowania, oraz analizy statystyczne.

Na kolejnych 45 stronach doktorantka przedstawia **wyniki badań**, które jednak, przy próbie ich lakonicznego podsumowania, nastroczają pewne trudności. Rozdział ten jest wzbogacony licznymi rycinami, znakomicie ilustrującymi uzyskane dane. Ta część pracy stanowi dowód niewątpliwie rzetelnej i żmudnej pracy wykonanej przez Doktorantkę, a ogrom przeprowadzonych badań i uzyskane wyniki budzą najwyższe uznanie.

W celu łatwiejszego **podsumowania** uzyskanych wyników Doktorantka zamieszcza najistotniejsze z nich, w kolejności przeprowadzonych procedur: *In vivo* na modelu dożylnym i następnie ortotopowym, *in vitro* na liniach komórkowych, *ex vivo* z wykorzystaniem krwi pobranej od pacjentek z rakiem piersi oraz zdrowych kobiet.

Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują, że najskuteczniejszym przeciwmiechanizmem schematem jest kombinacja donorów NO i CO oraz Clopidogrelu i donoru NO.

Na kolejnych 17 stronach autorka przeprowadza **dyskusję** wyników własnych porównując je i odnosząc się do innych opublikowanych prac. Dyskusja została oparta o najnowsze doniesienia naukowe i jest, podobnie jak wstęp pracy, merytoryczna, zwięzła i konkretna. Czyta się ją i analizuje z przyjemnością.

Na podstawie przeprowadzonych badań i statystycznej analizy otrzymanych wyników Kandydatka sformułowała 5 **wniosków**, które stanowią odpowiedź na ustalone wcześniej cele pracy. Wnioski są wyważone i w sposób logiczny wynikają z przeprowadzonych badań.

Po pierwsze w badaniach *in vivo* na dożylnym i ortotopowym modelu mysiego raka piersi kombinacje NO i CO, oraz NO i Clopidogrelu hamują powstawanie przerzutów. Wyższe stężenia NO i CO dają odwrotny efekt. Zahamowanie aktywacji płytek krwi jest skuteczne tylko we wczesnych stadiach progresji nowotworu, jednak w późniejszych jego stadiach leczenie przeciwpłytkowe działa proangiogenicznie. Kombinacja NO i CO ma silne działanie antymiechanizyczne tylko we wczesnych stadiach progresji guza hamując przejście nabłonkowo-mezenchymalne (EMT), adhezję komórkową i migrację. Kombinacja NO i Clopidogrelu zachowuje swoje działanie antymiechanizczne w późniejszych stadiach progresji prawdopodobnie poprzez zwiększenie biodostępności NO. Kombinacja NO i CO hamuje agregację płytek w pełnej krwi otrzymanej od pacjentek z rozsiały rakiem piersi. Kombinacja ta zmniejsza aktywację płytek poprzez zredukowanie uwalniania płytkowego TGF- β w badaniach *ex-vivo*.

Z obowiązku recenzenta, po szczegółowej lekturze pracy, pozwalam sobie przedstawić parę uwag, w żaden jednak sposób nie umniejszających wartości pracy.

Na stronie 42 został prawdopodobnie mylnie zapisany numer tabeli i powinno być Tabela 6.

Z analizy badania *in-vivo* na modelu dożylnym wynika, że w grupach kontrolnych dla schematów 1, 2 i 3 (co nie dotyczy schematu 4 z uwagi na szybszą eutanazję myszy z tej grupy) występują istotne różnice w liczbie znalezionych przerzutów, wartościach płytek krwi i leukocytów oraz innych badanych markerów. Jak Doktorantka tłumaczy te różnice? Czy nie można by było połączyć tych 3 grup kontrolnych w jedną wspólną grupę kontrolną dla wszystkich tych trzech schematów? Dałoby to sumarycznie liczniejszą grupę kontrolną i takie same wartości średnie badanych parametrów. Czy nie można by postąpić podobnie z grupą zdrowych myszy? Tu również widoczne są pewne rozbieżności w ekspresji ocenianych markerów i komórek krwi.

Na stronie 83 przy informacji o braku różnic w poziomie JON/A w nawiasie brakuje nazwy integryny. Prawdopodobnie powinno być $\alpha\text{IIb}\beta 3$.

Ponadto w przypadku badania *ex-vivo* nie zauważyłam informacji o lekach przyjmowanych przez grupy pacjentek od których została pobrana krew. W przypadku pacjentek hospitalizowanych na oddziale zabiegowym istnieje wysokie prawdopodobieństwo, że mają włączoną terapię drobnocząsteczkową heparyną, która w istotny sposób może zaburzyć wynik testu na agregację płytek. W takim wypadku powinna być ona odstawiona na co najmniej 14 dni przed planowanym testem. Stąd moje pytanie do Doktorantki: Czy posiada informacje o ewentualnie stosowanych lekach? Doktorantka, w dyskusji, wspomina, że wynik agregacji płytek u pacjentek z rozsianym rakiem piersi nie różnił się od tego u pozostałych grup kobiet. Co więcej, jest to wynik odmienny od spotykanych w literaturze, gdzie w grupie pacjentów z rozsianą chorobą nowotworową agregacja płytek jest nasiloną. Przy założeniu, że badana przez autorkę grupa pacjentów nie otrzymywała leków przeciwkrzepliwych to być może wpływ na taki wynik miała mała liczba chorych w tej grupie (8 pacjentek)?

Niezależnie od tych drobnych uwag i pytań skierowanych do Doktorantki, przedstawioną dysertację oceniam bardzo wysoko. Moim zdaniem zasługuje ona na wyróżnienie, przede wszystkim z uwagi na wagę poruszonego tematu, szeroki panel badań przeprowadzonych przez Doktorantkę oraz potencjalne implikacje kliniczne uzyskanych wyników. Niniejsza praca dostarcza ważnych odpowiedzi na pytania dotyczące wpływu donorów CO i NO oraz leku przeciwplatekowego na proces przerzutowania komórek raka piersi.

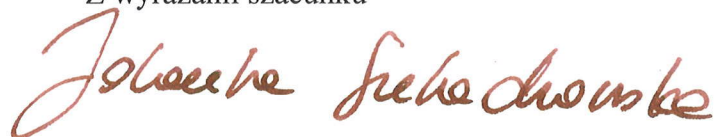
W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że Doktorantka potrafi samodzielnie sformułować i rozwiązać problem naukowy, właściwie dobrać techniki badawcze, a także prawidłowo przeprowadzić dyskusję otrzymanych wyników. Przedstawioną pracą jednoznacznie udowadnia, że posiada zdolności do prowadzenia dalszych samodzielnych badań naukowych.

Według mnie rozprawa doktorska Pani magister Ksenii Porshnevej pt.: „Clopidogrel oraz donory NO i CO: badanie ich wpływu na oddziaływanie pomiędzy płytkami krwi, śródbłonkiem a komórkami nowotworowymi” spełnia kryteria rozprawy naukowej określone

w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595, z późn. Zm).

W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda o dopuszczenie Pani Ksenii Porshnevej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku



Wrocław, 20 września 2018 roku.