

Prof. dr hab. inż. Maciej Bagiński
Katedra Technologii Leków i Biochemii
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska
Ul. Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk, Polska
Tel.: (58) 347 15 96
Fax: (+48) (58) 347 11 44
e-mail: chemmbag@pg.gda.pl



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

Gdańsk, 5.10.2018

**Recenzja pracy doktorskiej
Mgr. Kseniia Porshneva**

Pt.:

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

Przedstawiona mi do recenzji praca stanowi omówienie i dyskusję wyników badań prowadzonych przez mgr Porshneva pod kierunkiem Prof. dr hab. Joanny Wietrzyk w Laboratorium Eksperymentalnej Terapii Przeciwnowotworowej, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Celem pracy *sensu largo* było zbadanie i określenie aktywności przeciwprzerzutowej donorów NO i CO o właściwościach naczynioprotekcyjnych oraz leku przeciwplatekowego klopidogrelu, stosowanych samodzielnie lub w skojarzeniu. Praca doktorska pani Porshneva mieści się w szeroko pojętych badaniach zespołu pani Prof. Joanny Wietrzyk, która od lat zajmuje się badaniem różnych terapii i związków przeciwnowotworowych zwłaszcza w modelach zwierzęcych. Komentując cel pracy muszę stwierdzić, że jest niezwykle ciekawy i bardzo na czasie zwłaszcza w świetle przyznanej 3 października Nagrody Nobla z Chemii za rok 2018. Pół nagrody bowiem otrzymali dwaj badacze, George P. Smith, który opracował metodę fagowej ekspresji peptydów i Sir Gregory P. Winter, który wykorzystał tę właśnie metodę i użył jej do kontrolowania ewolucji przeciwciał by tworzyć nowe leki w tym do leczenia nowotworów. Okazuje się jednak, że samo uruchomienie układu odpornościowego człowieka i użycie odpowiednich przeciwciał, korzystając np. z metody Sir Wintera, nie jest w stanie zwalczyć nowotwory, które mogą niejako unikać takiego ataku. Komórki nowotworowe w fazie przerzutowania korzystają bowiem z naturalnych mechanizmów obronnych, uruchamianych w stanach zapalnych, które chronią je przed atakiem przeciwciał. Praca pani Porshneva, jest zatem niejako wyjściem poza to co zostało nagrodzone Nagrodą Nobla i przyjrzeniem się jak można byłoby w sposób kontrolowany modulować właściwości naczynioprotekcyjne i aktywność płytek krwi aby układ odpornościowy mógł walczyć skutecznie z komórkami nowotworowymi.

Zatem na samym początku swojej recenzji chciałbym zaznaczyć, że cel pracy był bardzo ambitny i jego realizacja przebiegała wielotorowo, a przeprowadzone badania pozwoliły na wyciągnięcie szeregu wniosków, w szczególności potwierdziły, iż stosowanie

donorów NO i CO i leku klopidogrelu wykazuje działanie przeciwprzerzutowe na drodze normalizacji funkcji śródbłonna i poprzez obniżenie aktywności płytek krwi. Wynik ten sugeruje, że zastosowanie takiej terapii w połączeniu z tradycyjnymi lekami przeciwnowotworowymi mogłoby mieć korzystny wpływ na leczenie choroby nowotworowej.

Na szczególne podkreślenie zasługuje element nowości naukowej zaprezentowany w pracy i to nie tylko w odniesieniu do tego co wynika z tematyki nagrodzonej Noblem, o czym pisałem wcześniej. Mimo, że ogólnie pojęta tematyka pracy nie jest zupełnie nowa, gdyż wiele zespołów zajmuje się badaniem mechanizmów przerzutowania nowotworów i powstrzymaniem tego zjawiska, a sama doktorantka sporo swoich wyników odnosi do danych literaturowych, to jednocześnie wiele otrzymanych przez nią danych pozwala na zupełnie nowe objaśnienie zachodzących zjawisk.

Aby móc zrealizować cel pracy pani Porshneva musiała zaplanować i przeprowadzić bardzo dużą ilość eksperymentów. Zakres pracy jest dość imponujący i obejmował badania *in vivo* na dożylnym i ortotopowym modelu przerzutującego mysiego raka gruczołu sutkowego. Prowadziła także badania *in vitro* w celu poznania mechanizmów rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych oraz prowadziła eksperymenty *ex vivo* z wykorzystaniem ludzkiej krwi pobranej od pacjentek cierpiących na przerzutującego raka piersi. Doktorantka samodzielnie wykonywała te liczne eksperymenty, a w ich realizacji korzystała z wielu metod oraz technik biochemicznych, immunobiologicznych i mikroskopowych. Można zatem powiedzieć, że świetnie opanowała trudny warsztat pracy.

Układ pracy:

Na początku chciałbym nadmienić, że pracę bardzo dobrze czyta się mimo, że jest stosunkowo długa i zawiera ogromną ilość detali i mimo, że jest napisana w j. angielskim. Praca ma klasyczny układ dla tego typu prac eksperymentalnych. Na początku przedstawione jest streszczenie, które wprowadza w pracę i przedstawia skrótowo jej cel. Po streszczeniu jest umieszczona lista użytych w pracy skrótów (niestety nie kompletna). Następnie praca zawiera obszerny i bardzo merytorycznie związany z celami pracy wstęp teoretyczny po którym znajduje się szczegółowy krótki rozdział prezentujący cel i zakres pracy. Po tym rozdziale następuje rozdział przedstawiający materiały i metody. Następnie doktorantka przedstawia rozdziały z wynikami i dyskusją z podziałem na obszary badań. Na końcu jest podsumowanie i spis literatury zawierający 258 pozycje. Niestety praca na końcu nie zawiera wyodrębnionej listy osiągnięć publikacyjnych doktorantki. Jedynie analiza spisu literatury zawartej w pracy pozwala na stwierdzenie, że w jednej z prac (pozycja 12) pani Porshneva jest współautorem.

Jeżeli chodzi o ogólną ocenę poszczególnych rozdziałów to treść ich jest bardzo merytoryczna. Generalnie nie mam do ich zawartości jakiś większych uwag. Listę uwag bardziej szczegółowych i pytań przedstawię poniżej. Rozdziały dotyczące materiałów i metod są bardzo wyczerpująco napisane. Wszystkie metody są jasno i przystępnie opisane jak również całe postępowanie eksperymentalne jest tak przedstawione, że inne osoby nie powinny mieć problemów z powtórzeniem poszczególnych eksperymentów. Dobór metod jest właściwy. Na wielu etapach pracy stosowano różne metody aby wysnuć wspólne wnioski. Stąd też potrzeba było wykonywać eksperymenty zarówno *in vivo*, *in vitro* jak i *ex vivo*. Na wyróżnienie zasługuje rozdział z przedstawieniem i dyskusją wyników i podsumowanie, w którym doktorantka umiejętnie systematyzuje wcześniej licznie zebrane dane. Rozdziały te są również bardzo przejrzyste napisane. Przedstawione dane nie budzą wątpliwości. Ich prezentacja, zwłaszcza w postaci wykresów z opracowaniem statystycznym jest profesjonalna i zawiera bardzo dużo szczegółów ważnych z punktu widzenia eksperymentalnego.

W całej pracy znajduje się też bardzo wiele odniesień do źródłowej (trochę starszej) i bieżącej literatury (nawet 8 prac z 2018 r. jest cytowane) co wskazuje na rozległą wiedzę

Doktorantki w obszarze prowadzonych badań. Przegląd literaturowy i analiza danych w dziedzinie objętej badaniami jest bardzo wnikliwa i ściśle związana z poszczególnymi zagadnieniami podejmowanymi w pracy doktorskiej.

Warto też pochwalić edytorski aspekt pracy związany z prezentacją rysunków i wykresów. Użyte legendy są bardzo profesjonalne. Pewne uwagi można mieć jednak do prezentacji zdjęć mikroskopowych, które są zbyt małe i nie widać na nich detali. Jeżeli chodzi o sam język pracy to jest bardzo poprawny. Znalazłem jedynie kilka błędów stylistycznych i tak zwanych literówek, co przy tak długim tekście jest trudne do uniknięcia.

Uwagi i komentarze ogólne:

Tak jak wspomniałem na wstępie praca jest bardzo ciekawa i nowatorska, a jej wyniki istotne ze względu na postęp wiedzy w dziedzinie badań nad terapiami przeciwnowotworowymi i związanym z tym procesem przerzutowania nowotworów. Mówiąc ogólnie autorce udało się zbadać i ustalić, że można za pomocą stosowanych w pracy związków modulować proces przerzutowania poprzez normalizację funkcji śródbłonna naczyń krwionośnych i obniżając aktywność płytek krwi, co może w skojarzeniu z innymi terapiami być wykorzystane w leczeniu nowotworów. Praca z tego względu niesie duży element nowości nie tylko naukowej ale i praktycznej. W końcowym rozdziale autorka przedstawia pięć konkluzji dotyczącej tej modulacji, które stanowią esencję pracy. Do tej części pracy i takiego przedstawienia wyników nie mam jako recenzent zastrzeżeń. Ze względu na brak spisu osiągnięć doktorantki nie wiadomo jednak czy wyniki te w całości zostały już opublikowane, przy czym na pewno są one jak najbardziej publikowalne.

Z obowiązku recenzenta chciałbym jednak zwrócić uwagę, że czytając pracę znalazłem kilka różnych miejsc gdzie nie w pełni byłem usatysfakcjonowany opisem, gdyż tekst nie zawierał wystarczającego opisu lub zawierał taki, który nie był w pełni zrozumiały. Stąd też poniżej przedstawiam kilkanaście uwag mniej lub bardziej szczegółowych (w tym edytorskich) wymagających komentarza.

Uwagi i komentarze szczegółowe (przy czym nie wszystkie wymagają odpowiedzi czy komentarza, gdyż stanowią jedynie uwagę):

Strona 9:

Spis skrótów jest niepełny. Np. nie zawiera skrótu LPS.

Strona 35:

Doktorantka opisuje tutaj mechanizm działania donora NO SNAP podając, że obniża on wpływ doksorubicyny z komórek nowotworowych HT29-dx. Nie wspomina jednak jaki jest mechanizm tego zjawiska zwłaszcza w kontekście podstawowych właściwości tego związku jako donora NO. Czy zjawisko to może być też obserwowane dla innych donorów NO?

Strona 44:

Doktorantka podaje, że klopidogrel użyty do badań był wyodrębniany z leku PLAVIX. Dlaczego? Czy nie można było kupić substancji czystej?

Strona 46:

Stężenie klopidogrelu użytego w badaniach określono na podstawie wcześniejszych badań przeprowadzonych w tym samym laboratorium ale brak jest odnośnika np. do literatury czy też porównania z badaniami innych grup.

Strona 47:

Z badań wykluczono kombinację CORM-A1 z kłopidogrelem, gdyż we wstępnych badaniach *in vivo* wykazywała pro-przerzutowe działanie. Wydaje się, że jakiś komentarz w tej sprawie byłby pożądany, tym bardziej iż układ ten, podobnie jak inne zastosowane, potencjalnie też miał wykazywać przeciwprzerzutowe działanie.

Strona 48:

Tabela 9 zawiera dawki, czyli stężenia stosowanych związków w modelach mysich. Niektóre z nich są takie, powiedzmy okrągłe jak 1 mg/kg/dzień czy 3 mg/kg/dzień, a inne podawane jak np. 2,358 mg/kg/dzień z dokładnością do trzech miejsc po przecinku. Z czego to wynika?

Strona 50:

Z racji tego, że jestem również inżynierem zapytam o wzór na objętość litego nowotworu przedstawiony na tej stronie. Można uznać go za poprawny ale jest on jedynie przybliżeniem. W sumie można było stosować dokładny wzór przy założeniu, że taki nowotwór jest kulą albo toroidem.

Strona 57:

Toksyczność badanych związków w eksperymentach *in vitro* wyznaczano w oparciu o ustalenie IC50 testem SRB. Czy Doktorantka może podać dlaczego akurat ten test wybrano?

Strona 67 i 73:

Zestawienie przedstawiające zdjęcia mikroskopowe mysich płuc jest mało czytelne, gdyż poszczególne zdjęcia są zbyt małe aby w pełni zauważyć różnice pomiędzy nimi.

Strona 68:

W tekście błędnie jest cytowany rysunek 7B1.

Strona 80:

Autorka podaje, że największy spadek masy ciała w grupie badanych myszy wynosił 3,24 %. W moim przekonaniu jest to niewiele i czy to jest statystycznie istotny wynik?

Strona 83:

Brakuje tekstu w nawiasie w ostatnim paragrafie co do nazwy integryny.

Strona 112:

Autorka na pierwszej stronie rozdziału Dyskusja niejako wraca do założenia swojej pracy i jest to bardzo dobre podejście, ale przy tym cytuje niewłaściwie literaturę podając prace z lat 2016-2018. Taki opis powinien być poparty pracami wcześniejszymi sprzed startu pracy doktorskiej, a te nowsze prace powinny raczej służyć do zobrazowania aktualności tematyki.

Strona 121:

Autorka aby wyjaśnić obserwowane w swoich doświadczeniach obniżenie liczby płytek krwi u myszy z nowotworami w stosunku do zdrowych myszy, co nie do końca zgadza się z danymi literaturowymi, proponuje przyjąć, że płytki krwi we krwi myszy z nowotworami agregują i nie da się ich policzyć w hemocytometrze. Czy takie wyjaśnienie, skąd inąd dość racjonalne, było lub może być potwierdzone przez jakieś inne podejście?

Strona 127:

Wyjaśnienie braku różnic w eksperymentach *ex vivo* co do stopnia agregacji płytek krwi we krwi pacjentów z nowotworami w różnej metastazie i bez w stosunku do zdrowych ludzi jest zbyt lakoniczne, tym bardziej, że jak Doktorantka wskazuje jest to niezgodne z danymi literaturowymi (praca Cooke NM *et al.*). Czy Doktorantka może przedstawić szerzej ten problem?

Generalna uwaga co do przedstawiania literatury w spisie:

Odnośniki w spisie literatury nie wszystkie zawierają pełny spis nazwisk. Domyślam się, że Doktorantce chodziło o skrócenie ilości stron ale w przypadku doktoratu nie jest to takie ważne. Pełen spis nazwisk ułatwia natomiast czytanie odnośników, gdyż często szefowie grup podawani są na liście nazwisk na końcu.

Podsumowanie:

Pomimo moich pewnych uwag krytycznych przedstawionych powyżej, z których część ma jedynie charakter pytań czy dyskusji naukowej lub uwag korekcyjnych, bardzo wysoko oceniam przedstawioną mi do recenzji pracę pani mgr Kseniia Porshneva. Zwłaszcza duży wkład nowości naukowej i osiągnięcie postawionych sobie ambitnych celów jest przeze mnie wysoko ocenione. Sama praca stanowi dokumentację oryginalnych badań prowadzonych przez Doktorantkę, które mam nadzieję, że są lub będą w całości opublikowane i mogą też znaleźć zastosowanie w praktyce medycznej.

Moim zdaniem praca doktorska pan Porshneva całkowicie, i to z naddatkiem, spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w pkt. 13 Ustawy o tytule i stopniach naukowych. Praca wskazuje także, że Doktorantka posiada rozległą wiedzę w dziedzinie ogólnie pojętej farmakologii molekularnej. W toku realizacji pracy wykazała Ona również umiejętność samodzielnego prowadzenia skomplikowanych badań naukowych w różnych obszarach od biochemii przez biologię do farmakologii i immunologii. Z podanych wyżej względów wnioskuję do Rady Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN o dopuszczenie pani mgr Kseniia Porshneva do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marek Bogdan