



dr hab. Renata Jastrzęb, prof. UAM  
Wydział Chemii  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu  
Zakład Chemii Koordynacyjnej  
e-mail: [renatad@amu.edu.pl](mailto:renatad@amu.edu.pl)  
tel.: 618291712

Poznań 22.08.2022

Dziekan  
Wydziału Nauk o Zdrowiu  
prof. dr hab. Alina Borkowska

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU

25. 08. 2022

Dziekanat Wydziału Nauk o Zdrowiu

L.dz. ....

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Kaźmierskiego

„Toksyczność leków przeciwnowotworowych na komórki macierzyste płynu  
owodniowego”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr Łukasza Kaźmierskiego została wykonana w Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem Pani dr hab. Anny Bajek, prof. UMK. Tematyka badawcza realizowana w kierowanym przez prof. Annę Bajek Zakładzie Inżynierii Tkankowej Wydziału Lekarskiego to w głównej mierze:

- optymalizacja technik izolacji komórek macierzystych ze źródeł płodowych;
- nowotworowe komórki macierzyste i ich rola w procesie nowotworzenia;
- biogodność materiałów o potencjalnym zastosowaniu w inżynierii tkankowej;
- cytotoksyczność związków biologicznie czynnych o potencjalnym zastosowaniu w terapii przeciwnowotworowej.

Praca doktorska Pana mgr. Łukasza Kaźmierskiego doskonale wpisuje się w tą tematykę i niewątpliwie przyczynia się do rozwijania dotychczasowych osiągnięć Katedry Urologii i Andrologii.

Otrzymana do recenzji rozprawa doktorska pod tytułem „Toksyczność leków przeciwnowotworowych na komórki macierzyste płynu owodniowego” poświęcona jest badaniom parametrów komórek macierzystych płynu owodniowego poddawanych działaniu chemioterapeutyków: cisplatyny, karboplatyny, winblastyny, doksorubicyny

i 5-fluorouracylu. W pracy badano aktywność metaboliczną, tempo proliferacji, kinetykę wzrostu, poziom apoptozy, zmiany w cyklu komórkowym oraz starzenie komórkowe. Dodatkowo Doktorant przeprowadził analizę zmian morfologicznych w oparciu o obrazowanie superrozdzielcze z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego.

Praca doktorska, została napisana w układzie klasycznym, obejmuje 208 stron, w tym 10 stron wstępu literaturowego, opartego na 80 bardzo dobrze dobranych odnośnikach literaturowych oraz 101 stron części doświadczalnej obejmującej części takie jak: materiały, metody, wyniki, wnioski oraz streszczenia. Ponadto praca zawiera wykaz stosowanych skrótów, spisy tabel i rycin oraz niezbędne załączniki takie jak zgody komisji bioetycznych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant, jest współautorem 11 prac o obiegu międzynarodowym, w których zawarł wyniki swoich badań, także tych realizowanych w czasie doktoratu, które zostały zacytowane 167 razy a Index Hirsha tych prac wynosi 5 (zgodnie z bazą Scopus z dnia sporządzania recenzji).

Praca napisana jest w sposób logiczny i zrozumiały jednak z bardzo ogólnie sformułowanym celem. Biorąc pod uwagę szeroki zakres przeprowadzonych badań doprecyzowanie określenia „kompleksowa ewaluacja” pozwoliłoby swobodniej oceniać realizację założonego zadania. Nie mniej jednak przy tak ogólnie postawionym celu można stwierdzić, że został on osiągnięty.

Dysertacja została przygotowana starannie, jednak obowiązkiem każdego recenzenta jest wskazanie drobnych błędów. Wszelkie drobne omyłki edytorskie, potknięcia językowe czy interpunkcyjne, które pojawiają się w pracy w żaden sposób nie umniejszają jej wartości i nie ma konieczności aby się nad nimi szczególnie pochyłać. Uwagi, które nie dotyczą części merytorycznej pracy pozwalam sobie zamieścić poniżej.

- W „Wykazie wybranych skrótów” autor zawarł rozwinięcie nazw tylko wybranych związków chemicznych oraz niektórych metod badawczych, a zabrakło w nim innych stosowanych w pracy skrótów jak np. DMEM, FBS, HCS, PH3, określenia faz G1, S oraz G2 itd.
- Zebranie stosowanych odczynników oraz sprzętu w osobnym rozdziale, gdzie znajdowały by się parametry techniczne takie jak czystość, stężenia, dane producenta

pozwoliłoby na zwiększenie czytelności tekstu w rozdziale Materiał i metody oraz zebrałoby informacje techniczne w jednym miejscu.

- Nie odnotowałam informacji na temat pochodzenia badanych chemioterapeutyków. Czy były to handlowe koncentraty do sporządzania roztworów do infuzji? Jeśli tak to jaki był wyjściowy skład koncentratów oraz kto był ich producentem?
- W tabeli 3 w kolumnie Stężenie [ $\mu\text{M}$ ] znajduje się zapis stosowanego skrótu 01 zamiast faktycznej wartości liczbowej 0,1. Ponadto dokładność podawanych stężeń powinna być jednakowa czyli do 1 miejsca po przecinku.
- Na Rycinie 61 znajdują się błędne skróty stosowanych roztworów oraz jeden z nich jest powtórzony. Biorąc jednak pod uwagę staranny i regularnie stosowany przez Doktoranta zapis można łatwo rozpoznać jakie próbki znajdują się na rysunku.
- Część pracy napisana jest inną czcionką, co oczywiście nie jest błędem.

Praca doktorska została przygotowana starannie, a przytoczone uwagi stanowią bardziej fanaberie recenzenta niż realne niedociągnięcia.

### OCENA MERYTORYCZNA

Celem pracy doktorskiej Pana mgr. Łukasza Kaźmierskiego była „kompleksowa ewaluacja cytotoksycznego wpływu obecnie stosowanych leków przeciwnowotworowych na komórki macierzyste płynu owodniowego”. Przy tak ogólnie postawionym celu pracy nasuwa się pytanie czy faktycznie udało się przeprowadzić ewaluację wszystkich możliwych parametrów, aby można było powiedzieć, że była to analiza kompleksowa. Sam Doktorant w podsumowaniu pisze „Podsumowując, mimo przeprowadzenia szerokiego spektrum badań interakcji pięciu chemioterapeutyków z AFSCs, nadal pozostaje wiele niezbadanych parametrów, które mogą pozwolić w pełni zrozumieć wpływ badanych substancji na komórki macierzyste płodu.” Nie ulega jednak wątpliwości, że Doktorant przeprowadził bardzo wnikliwą analizę aktywności metabolicznej, tempa proliferacji, określił kinetykę wzrostu, poziom apoptozy, zmiany w cyklu komórkowym a także starzenie komórkowe. Dodatkowo przeprowadzono analizę zmian morfologicznych w oparciu o obrazowanie superrozdzielcze szkieletu F-Aktynowego i wimentynowego z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego. Przy tak szeroko potraktowanym temacie można uznać, że założony cel został osiągnięty.

Zabrakło mi jednak w pracy precyzyjnie wyciągniętych wniosków, a te przedstawione na stronie 116 są bardzo ogólne i nie oddają wkładu jaki Doktorant włożył w swoją niezwykle ciekawą pracę. Stwierdzenia „Wszystkie badane leki wykazywały cytotoksyczny charakter w odniesieniu do komórek macierzystych płynu owodniowego.” czy też „Działanie cytotoksyczne uwarunkowane było zarówno czasu i stężenia badanych substancji jak i poziomu starzenia badanych komórek.” można było zastąpić wnioskami z przeprowadzonych badań, które doktorant zawarł częściowo w podsumowaniu na stronie 114 np. „Istotnym spostrzeżeniem jest też niższy poziom cytotoksyczności na AFSCs o wyższym stopniu starzenia biologicznego, co może sugerować potencjalnie bezpieczniejsze użycie chemioterapii w późniejszych etapach rozwoju płodu.”

Pozostałe drobne uwagi/sugestie dotyczące merytorycznej oceny pracy doktorskiej Pana mgr. Łukasza Kaźmierskiego przedstawione zostały poniżej.

- W części teoretycznej zabrakło informacji według jakiego kryterium Doktorant wybrał do badań 5 chemioterapeutyków, czy wynika to z ich powszechności stosowania czy podobnej farmakokinetyki? Zdaję sobie sprawę, że przebadanie wszystkich substancji jest niemożliwe ale zdanie wy tłumaczenia dlaczego nie włączono do badań innych substancji stosowanych w zwalczaniu typowych u kobiet chorób nowotworowych jak bleomycyna, ifosfamid, irynotekan, medroksyprogesteron, metotreksat, mitomycyna, paklitaksel, pirarubicyna byłoby cenne.
- Kluczową rolę, w przypadku określenia skuteczności stosowanych leków odgrywa ich stężenie. Proszę o deprecyzowanie dlaczego w przypadku cisplatyny oraz karboplatyny jako rozpuszczalnik zastosowana została czysta sól fizjologiczna? Co spowodowało, że nie użyto buforowanej fosforanem soli fizjologicznej dla wszystkich badanych związków? Czy fakt ten wynika z zawartości dodatkowych substancji znajdujących się w PBS takich jak fosforany, chlorek potasu czy może wynika z nieznacznie obniżonej zawartości NaCl w stosunku do roztworu soli fizjologicznej, co może mieć znaczenie ze względu na fakt, że te dwa chemioterapeutyki rozkładają się po rozpuszczeniu w środowisku o niskiej zawartości jonów chlorków.
- W opisie zabrakło wy tłumaczenia dlaczego w przypadku Karboplatyny oraz 5-Fluorouracyl przygotowano roztwory bardziej stężone CA1000 i 5FU1000. Czy jest

to powiązane ze stężeniem poszczególnych chemioterapeutyków odnotowanych we krwi pacjentów, Tabela 1? Dlaczego nie były badane próbki o najniższych stężeniach 0,1µM w przypadku tych chemioterapeutyków?

- Zabrakło mi również wyraźnego podkreślenia dla jakich stężeń poszczególnych chemioterapeutyków znaleziono tzw. efekt biologiczny, czyli rezultat możliwy do zaobserwowania w zastosowanych testach biologicznych.

Należy podkreślić fakt, że Pan mgr Łukasz Kaźmierski zrealizował założony w swojej dysertacji cel, a uzyskane wyniki są bardzo interesujące i poruszają niezwykle istotne problemy związane z występowaniem choroby nowotworowej u kobiet w ciąży. Dogłębna analiza przygotowanej przez Doktoranta dysertacji, wskazuje że zawarto w niej wszystkie założenia pracy. Doktorant przeprowadził szczegółową analizę działania pięciu chemioterapeutyków cisplatyny, karboplatyny, winblastyna, doksorubicyna oraz 5-Fluorouracylu o różnych stężeniach na komórki macierzyste płynu owodniowego. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorant wykazał między innymi, że ludzkie komórki macierzyste płynu owodniowego stanowią bardzo czuły model do badań cytotoksycznych określających wpływ chemioterapeutyków.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr. Łukasza Kaźmierskiego stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, doktorant wykazał się wiedzą teoretyczną w dyscyplinie oraz posiada umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych i spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, które określone zostały w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. Ustaw 2017 r. poz. 1789) i wnioskuję o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem



Renata Jastrząb