



**UNIwersytet Medyczny**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**mgr Urszula Szwedowicz**

Wpływ elektroporacji na transport dwukierunkowy,  
procesy fizjologiczne oraz komunikację między komórkami  
nowotworowymi, badania *in vitro*

**Rozprawa doktorska**

Impact of Electroporation on Bidirectional Transport,  
Physiological Processes, and Communication Between  
Cancer Cells: In Vitro Studies

**Doctoral thesis**

Wykonana w Katedrze i Zakładzie Biologii Molekularnej i Komórkowej  
Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Pod kierunkiem promotorów

**dr hab. inż. Anny Choromańskiej, prof. uczelni**  
**oraz dr Agnieszki Chwiłkowskiej**

Wrocław, 2024

*Pragnę podziękować moim promotorom*

***dr hab. inż. Annie Choromańskiej oraz dr Agnieszce Chwiłkowskiej***

*za okazaną mi dobroć, cierpliwość i wyrozumiałość oraz wszelką pomoc  
potrzebną podczas realizacji niniejszej rozprawy.*

*Swoje podziękowania kieruję również do*

*Pani Kierownik Katedry i Zakładu Biologii Molekularnej i Komórkowej*

***prof. dr hab. inż. Julity Kulbackiej***

*za wsparcie, zaufanie i wiarę we mnie oraz codzienną życzliwość.*

*Dziękuję członkom zespołu Katedry i Zakładu Biologii Molekularnej i*

*Komórkowej – **Ninie Rembiałkowskiej, Annie Szweczyk, Dagmarze***

***Baczyńskiej, Katarzynie Biezuńskiej-Kusiak i Edycie Podolan** za nieustającą  
chęć niesienia mi bezinteresownej pomocy oraz słowa wsparcia i otuchy.*

*Serdecznie dziękuję również (jeszcze) **mgr Zofii Łapińskiej i mgr Agnieszce***

***Gajewskiej-Narynieckiej** za wspólną krętą drogę krętymi ścieżkami doktoratu.  
Za wszystkie rozmowy, wsparcie i wieczory spędzone razem przy pipetowaniu.*

*... a przede wszystkim*

*dziękuję mojej **Najukochańszej Mamie** i mojemu **Marcinowi***

*za wiarę we mnie, nieocenione wsparcie i ogromne pokłady cierpliwości.*

*Bez Was by się nie udało.*

# 1 SPIS TREŚCI

---

2	Wstęp.....	5
2.1	Elektroporacja.....	7
2.1.1	Podział elektroporacji.....	8
2.1.2	Wpływ elektroporacji na struktury wewnątrzkomórkowe.....	10
2.2	Mikropęcherzyki pozakomórkowe.....	13
2.2.1	Budowa i zawartość pozakomórkowych mikropęcherzyków.....	13
2.2.2	Uwalnianie EVs i dystrybucja.....	18
2.2.3	EVs a rozwój i progresja nowotworu.....	19
3	Cel i założenia pracy.....	22
4	Materiały i metody.....	24
4.1	Materiały.....	24
4.1.1	Hodowla komórkowa.....	25
4.2	Metody.....	27
4.2.1	Warunki elektroporacji.....	27
4.2.2	Test żywotności i proliferacji - wpływ elektroporacji na komórki.....	27
4.2.3	Badanie wydajności elektroekstrakcji.....	28
4.2.4	Izolacja mikropęcherzyków (MVEs).....	30
4.2.5	Weryfikacja mikropęcherzyków pozakomórkowych przy użyciu testu ELISA.....	31
4.2.6	Obrazowanie mikropęcherzyków przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM).....	31
4.2.7	Ocena ilościowa i jakościowa mikropęcherzyków.....	32
4.2.8	Testy żywotności i proliferacji - wpływ MVEs na komórki.....	34
5	Wyniki.....	38
5.1	Test żywotności i proliferacji - wpływ elektroporacji na komórki.....	38
5.2	Badanie wydajności elektroekstrakcji.....	39
5.2.1	Analiza fluorescencji z wykorzystaniem systemu Incucyte®.....	39
5.2.2	Cytometria przepływowa.....	42
5.3	Weryfikacja mikropęcherzyków pozakomórkowych przy użyciu testu ELISA.....	44
5.4	Obrazowanie mikropęcherzyków przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM).....	45
5.4.1	Ocena ilościowa i jakościowa mikropęcherzyków.....	47
5.4.2	Analiza ilościowa MVEs.....	47
5.4.3	Analiza rozkładu wielkości MVEs.....	48
5.4.4	Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS).....	50

5.4.5	Testy żywotności i proliferacji - wpływ MVEs na komórki .....	51
5.4.6	Test zarastania ran do oceny migracji i proliferacji komórek.....	53
5.4.7	Analiza impedancji przy użyciu systemu RTCA-iCELLigence™.....	58
5.4.8	Oznaczanie całkowitej kinazy adhezji ogniskowej (FAK) za pomocą testu ELISA .....	59
5.4.9	Oznaczanie poziomów E-kadheryny i N-kadheryny za pomocą cytometrii przepływowej 61	
6	Dyskusja .....	67
7	Wnioski .....	75
8	Streszczenie .....	76
9	Abstract .....	78
10	Bibliografia.....	80
11	Spis rycin.....	92
12	Wykaz osiągnięć .....	95
12.1	Publikacje w czasopiśmie z IF .....	95
12.2	Rozdziały w monografiach naukowych.....	95
12.3	Zjazdy konferencyjne.....	96

## 2 WSTĘP

---

Ekspozycja komórek i tkanek na działanie krótkich impulsów elektrycznych o amplitudzie wystarczającej do zwiększenia przepuszczalności błon biologicznych, najczęściej zwana elektroporacją czy elektropermabilizacją, to technika stosowana w wielu dziedzinach naukowych, obecnie głównie z zakresu biologii i medycyny. Celem stosowania tej techniki jest umożliwienie lub ułatwienie pokonania bariery jaką jest błona komórkowa przez biocząsteczki, które w fizjologicznych warunkach, ze względu na rozmiar, strukturę czy ładunek elektryczny, nie mogłyby przez nią przeniknąć. Zastosowanie odpowiednio dobranego pola elektromagnetycznego skutkuje powstaniem w błonach biologicznych przestrzeni hydrofilowych zwanych porami, które stanowią dodatkowe, ale i tymczasowe miejsca wnikania różnych molekuł. To elektroporacja była i jest w wielu badaniach i eksperymentach kluczem do sukcesu w terapiach przeciwnowotworowych lub genowych w których główną przeszkodą było dostarczenie w nienaruszonym stanie cząsteczki czy to leku czy RNA do miejsca docelowego, czyli trudnodostępnego wnętrza komórki.

Elektroporacja niewątpliwie powoduje stres komórkowy i ma nie tylko wpływ na błonę elektroporowanej komórki, ale również na jej liczne struktury wewnętrzne. Impulsy elektryczne prowadzą do powstania wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu, które utleniają lipidy przez co zmienia się skład i właściwości zarówno błon komórkowych jak i dwuwarstw lipidowych organelli. Podobnie działa na inne struktury białkowe w tym na kanały jonowe wpływając tym samym negatywnie na równowagę osmotyczną komórki oraz na sam cytoskielet zaburzając jego trójwymiarowe struktury. Wpływ impulsów elektrycznych na elektroporowane komórki przekłada się na zmiany w procesach komunikacji między komórkami na poziomie molekularnym i w horyzontalnym transferze cząstek biologicznych. Tak jak w przypadku innych bodźców stresogennych, takich jak niskie pH, siła mechaniczna czy zbyt wysoka temperatura, elektroporacja powoduje odpowiedź komórkową i wydzielanie substancji sygnałowych. Sygnalizacja komórkowa może przybierać różne postaci, w zależności od zasięgu oddziaływania cząsteczek. Jedną z nich są mikropęcherzyki pozakomórkowe, które ze względu na swoją budowę, która pozwala na ochronę delikatnych molekuł, są nośnikami różnorodnych informacji, które mogą zostać przekazane zarówno do sąsiadujących komórek jak i odleglejszych struktur. Są one wydzielane przez wszystkie rodzaje komórek, zarówno te prawidłowe jak i patologiczne. Ich

ilość i rodzaj przenoszonej informacji molekularnej jest odzwierciedleniem tego, czego komórka doświadczyła.

Wiemy już, że zastosowanie m.in. impulsów elektrycznych powoduje nadprodukcję mikropęcherzyków pozakomórkowych przez komórki, co jest obecnie chętnie wykorzystywane w ich masowej produkcji, np. jako nośników leków czy jako wektorów dostarczających RNA ze względu na ich budowę i właściwości biologiczne, które ułatwiają dostarczanie ładunku do wnętrza komórek docelowych a to często przesądza o sukcesie terapii. Sama elektroporacja jest również wykorzystywana w procesach napełniania tych błoniastych struktur poprzez utworzenie tymczasowych porów w ich błonie, które umożliwiają wniknięcie terapeutycznego.

Nie zostało jednak dokładnie zbadane w jaki sposób kliniczne zastosowanie elektroporacji w onkologii wpływa na wydzielanie mikropęcherzyków pozakomórkowych z elektroporowanych komórek nowotworowych. Czy parametry stosowane w klinice, tak drobiazgowo dobierane, aby skuteczność elektrochemioterapii czy elektroporacji nieodwracalnej była jak najwyższa, istotnie powodują zwiększoną sekrecję mikropęcherzyków. Czy takie impulsy elektryczne powodują, że uwalniane mikropęcherzyki mają odmienny profil proteomiczny, wpływając tym samym na skuteczność terapii przeciwnowotworowej i dalszym przebiegu choroby.

## 2.1 ELEKTROPORACJA

Pierwsze doniesienia na temat wykorzystania zewnętrznego pola elektrycznego do permabilizacji, czyli zwiększenia przepuszczalności błon biologicznych pochodzą z wczesnych lat 70 ubiegłego stulecia, kiedy to prof. Eberhard Neumann i prof. Kurt Rosenheck potwierdzili eksperymentalnie, że impulsy elektryczne powodują przejściowe zmiany w przepuszczalności błon pęcherzyków (1). Sam termin „elektroporacja” pojawił się po raz pierwszy na początku lat 80 XX. w kolejnej z prac prof. Neumanna i pozwolił zrozumieć naturę tej techniki polegającej na tworzeniu się porów w błonie cytoplazmatycznej komórki poddanej wpływowi pola elektrycznego (2). Zaproponowanie tego wyrażenia pomogło również w ujednoczeniu języka dotyczącego tej techniki i ułatwiło jej szerokie uznanie i zastosowanie w środowisku naukowym. Obecnie elektroporację, inaczej permabilizację, definiuje się jako technikę wykorzystującą krótkie impulsy elektryczne o wysokim napięciu do utworzenia tymczasowych porów w błonach cytoplazmatycznych dzięki którym cząsteczki takie jak białka, chemioterapeutyki i DNA czy RNA mogą przedostać się do wnętrza komórki (3). Jest to jednak nadal bardzo ogólne sformułowanie, nieodnoszące się w pełni do wszystkich podtypów tej techniki.

Główną zaletą elektroporacji cenioną przez naukowców wielu dziedzin jest uniwersalność (4). Poddane działaniu pola elektrycznego mogą być wszystkie struktury, które posiadają dwuwarstwę lipidową, czyli zarówno proste błoniaste pęcherzyki jak i komórki każdego typu w dowolnej konfiguracji: w zawiesinie, adherentne do podłoża czy też formujące struktury trójwymiarowe jak sferoidy czy całe tkanki.

Elektroporację wykonuje się przy użyciu elektroporatorów, specjalnie zaprojektowanych urządzeń, które umożliwiają dostarczenie impulsów elektrycznych o określonym napięciu, ilości i amplitudzie do komórek i tkanek, umożliwiając tym samym naukowcom i klinicytom pełną kontrolę podczas permabilizacji błon, czyniąc samą elektroporację wydajną oraz bezpieczną (5). Oprócz dobrania parametrów elektroporacji do rodzaju elektroporowanej struktury i pożądanego efektu, kluczowe znaczenie dla skutecznej elektroporacji ma również dobór elektrod. W badaniach *in vitro* najczęściej są stosowane kuwety z wbudowanymi we wnętrzu dwoma elektrodami służące do elektroporacji komórek w zawiesinie lub w postaci elektrody kontaktowej którą przykładana się do powierzchni z wcześniej przygotowanymi adherentnymi komórkami.

### 2.1.1 Podział elektroporacji

Elektroporację można podzielić na kilka typów w oparciu o różne kryteria, w tym czas trwania i siła impulsów elektrycznych, skalę, w jakiej jest stosowana oraz specyficzne zastosowania, do których jest używana (6). Tradycyjnym podziałem używanym w klinice jest ten oparty na końcowym efekcie elektroporacji komórek, który jest zależny od przyjętych parametrów(7). W tym podziale wyróżniamy:

- Elektroporację odwracalną (z ang. *Reversible electroporation* – RE) w której są wykorzystywane impulsy elektryczne rzędu kilkuset do kilku tysięcy V/cm i na tyle silne, aby permabilizacja błony komórkowej była możliwa jedynie tymczasowo przy jednoczesnym zachowaniu żywotności komórek. Celem RE jest wprowadzenie do komórki różnych cząsteczek, które w warunkach prawidłowych nie pokonałyby bariery w postaci błony cytoplazmatycznej.

- Elektroporację nieodwracalną (z ang. *Irreversible electroporation* – IRE), która bezpośrednio powoduje śmierć komórki poprzez trwałe uszkodzenie jej błony komórkowej (8). Warunkiem jest zastosowanie impulsów elektrycznych o dużym natężeniu (zazwyczaj powyżej tysiąca V/cm) i/lub długiego czasu działania pola elektrycznego.

#### 2.1.1.1 Elektrochemioterapia

Szczególnym rodzajem elektroporacji odwracalnej jest elektrochemioterapia (z ang. *Electrochemotherapy* - ECT), której celem jest jak najwydajniejsze podanie leku do wnętrza komórek nowotworowych, tym samym wielokrotnie, nawet do kilku tysięcy razy, zwiększając efekt jego działania i skuteczność terapii (9,10). Jest ona obecnie jedną z najczęściej wybieranych strategii w leczeniu nowotworów lekoopornych, czyli o zmniejszonej wrażliwości na dedykowane cytostatyki. W tym rodzaju elektroporacji intencjonalnie nie są stosowane wysokie parametry elektroporacji, które doprowadziłyby bezpośrednio do śmierci komórki a takie, które jedynie „utorują” drogę leku do wnętrza komórki (11). Leku, który ze względu na swoją budowę, wielkość czy właściwości hydrofilowe, nie przekroczy samodzielnie bariery, jaką jest błona komórkowa.

Mnogość rodzajów nowotworów i pomysłów na terapię skłoniła naukowców zajmujących się elektroporacją i ECT do uporządkowania i ujednolicenia wiedzy tak, aby mogła mieć ona zastosowanie w warunkach klinicznych. W międzynarodowym projekcie ESOPE (Europejskie standardowe procedury operacyjne dla elektrochemioterapii i elektrogenetyki – z ang. *European standard operating procedures for electrochemotherapy and*



*electrogenetherapy*) zebrano, na podstawie wieloletnich badań *in vitro* i *in vivo*, najważniejsze procedury, które zapewniały jednocześnie wysoką skuteczność terapii z wykorzystaniem impulsów elektrycznych jak i bezpieczeństwo pacjenta (12). Pod uwagę wzięto rodzaj nowotworu, zastosowanego leku, jego drogi podania oraz wykorzystywanego sprzętu. Efektem prac było ustalenie standardowych procedur operacyjnych, w tym doboru elektroporatorów i elektrod, i wskazanie parametrów elektroporacji jako wiodących (13). Najczęściej mianem „protokołu ESOPE” w ECT określa się wykorzystanie 8 prostokątnych pulsów elektrycznych trwających 100  $\mu$ s, o częstotliwości 1 Hz, przy czym natężenie pola elektrycznego zazwyczaj mieści się w granicach 500-2000kV/cm (14,15).

Obecnie ECT jest stosowana standardowo w nowotworach skórnych i podskórnych, ale jest również skuteczna w przypadku każdego rodzaju guzów litych, szczególnie tych nieoperacyjnych, znajdujących się w bliskim sąsiedztwie delikatnych struktur jak większe naczynia krwionośne czy nerwy (16). Główną przeciwnością terapii jest anatomia, która dyktuje rozmieszczenie elektrod i obszar działania pola elektrycznego. Największą skuteczność tej terapii obserwujemy w leczeniu czerniaka, mięsaków Kaposiego i gładkokomórkowych, rozsianego raka piersi oraz innych nowotworów głowy i szyi. Cytostatykami o udowodnionej najwyższej skuteczności stosowanymi w tego rodzaju terapii są bleomycyna i cisplatyna (17). Są one podawane pacjentowi dożylnie lub miejscowo do guza a następnie po kilku minutach wykonywana jest elektroporacja. Zabieg może być wykonywany w znieczuleniu miejscowym lub ogólnym i charakteryzuje się niewielkimi skutkami ubocznymi choćby ze względu na to, że wprowadzanie elektrod powoduje niewielkie rany, które nie są głębsze jak kilka centymetrów, a stężenie podawanego chemioterapeutyku jest wielokrotnie niższe niż ma to miejsce w klasycznej chemioterapii (15).

## **2.1.2 Wpływ elektroporacji na struktury wewnątrzkomórkowe**

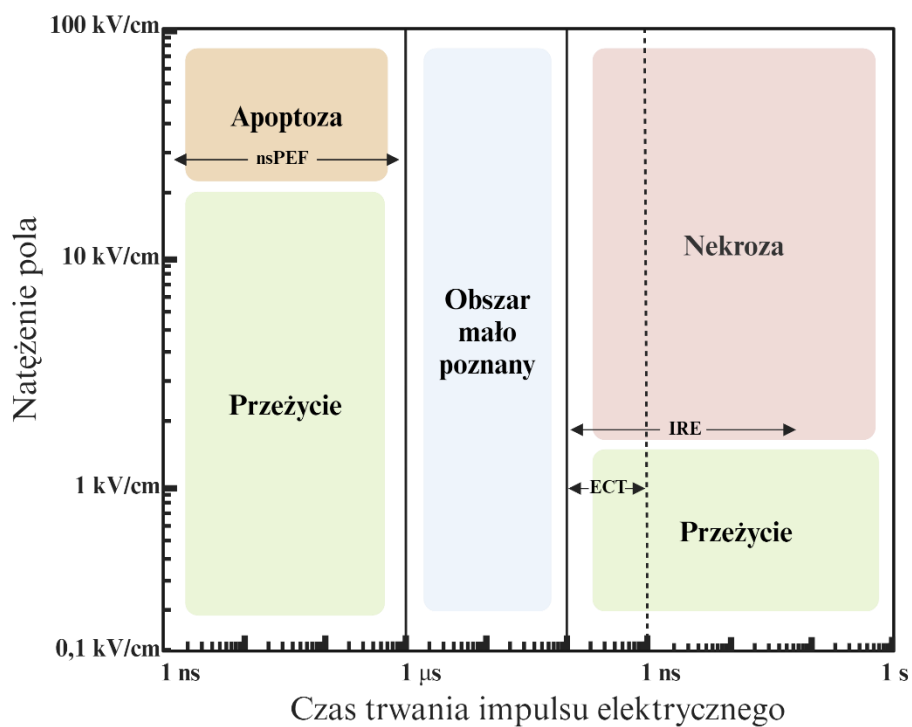
### **2.1.2.1 Zjawisko tworzenia się porów**

Błony biologiczne, zgodnie z modelem płynnej mozaiki, składają się przede wszystkim z przestrzennie zorientowanych fosfolipidów, które samoorganizują się w płynną dwuwarstwę stanowiącą miejsce zakotwiczenia się białek, które w sposób selektywny kontrolują przezbłonowy transport jonów i cząsteczek (18,19). Sama dwuwarstwa jest słabo przepuszczalna dla cząsteczek o charakterze hydrofilowym ze względu na jej charakterystyczną amfifilową strukturę, jednakże niekwalencyjne oddziaływania pomiędzy lipidami powodują, że ciągłość dwuwarstwy zostaje miejscowo zaburzona przez utworzenie porów wodnych (19,20). Występowanie porów w błonie jest zjawiskiem naturalnym choć rzadkim, bo energochłonnym, które wynika m.in. z jej niestabilności i asymetrii, przypadkowym rozkładzie białek zdolnych do dyfuzji bocznej oraz pasywnym przenikaniem cząsteczek obdarzonych ładunkiem przez membranę. Prawdopodobieństwo utworzenia się porów znacznie wzrasta w obecności niektórych detergentów lub pod wpływem sił zewnętrznych, w tym siły mechanicznej czy pola elektrycznego (21). Poprzez modelowanie molekularne i eksperymenty *in vitro* potwierdzono, że pory indukowane przez obecność pola elektrycznego powodują zmiany strukturalne prowadzące do zwiększonej przepuszczalności błony komórkowej i wzrostu mierzonego prądu elektrycznego przepływającego przez membranę (22,23).

### **2.1.2.2 Wpływ EP na organelle i cytoszkielet**

Elektroporacja wpływa nie tylko na błonę komórkową, ale również na inne, kluczowe organella o błoniastej strukturze. W zależności od zastosowanych parametrów, wpływ impulsów na elementy strukturalne komórki może być bezpośredni lub pośredni. Pory mogą utworzyć się w błonach organelli tylko w przypadku zastosowania nanosekundowych impulsów o wysokim napięciu, które są na tyle krótkie, aby nie doszło do uszkodzeń termicznych, i na tyle silne, aby pokonać dodatkową barierę, jaką stanowi błona komórkowa i cytozol (24–27). Jednocześnie, utworzonych porów jest więcej, ale mają mniejszą średnicę niż w przypadku klasycznej elektroporacji. Stosowanie nanosekundowego impulsowego pola elektrycznego (ang. *Nanosecond pulsed electric field* – nsPEF) umożliwia więc bezpośredni wpływ na wewnętrzne elementy strukturalne komórki, prowadząc do zwiększonej przepuszczalności ich błon co objawia się przykładowo w mitochondriach depolaryzacją błon

i uwolnieniem przez utworzone pory cytochromu C, w lizosomach uwolnieniem różnych enzymów a w przypadku siateczki endoplazmatycznej – uwolnieniem jonów wapnia co może prowadzić, odmiennie niż w przypadku IRE, do wywołania stresu oksydacyjnego i, w konsekwencji, apoptozy komórki (28–30). Z kolei konwencjonalna elektroporacja o parametrach najczęściej stosowanych w elektrochemioterapii (8 impulsów, 100  $\mu$ s, 1 Hz) powoduje zachwianie równowagi osmotycznej komórki, niekontrolowany napływ i odpływ jonów, prowadząc do zmian w składzie cytozolu czy wartości pH, zaburzenia działania pomp protonowych, pośrednio wpływając na środowisko wewnętrzne komórki (31).



**Rycina 1** "Mapa" w postaci wykresu w postaci wykresu logarymicznego obrazująca efekty elektroporacji, które są zależne od zastosowanego natężenia pola elektrycznego i czasu trwania impulsu. Zmodyfikowano na podstawie (30)

Cytoszkielecik, składający się z mikrofilamentów aktynowych, mikrotubul, filamentów pośrednich i septyny, zapewnia komórce wytrzymałość mechaniczną i stanowi rusztowanie dla organelli (32). Nadaje on komórce kształt i objętość, umożliwia jej kurczenie się i zapewnia wsparcie błonie komórkowej. Podstawowe funkcje komórki, takie jak proliferacja, migracja, sygnalizacja komórka-komórka czy komórka-środowisko, nie byłyby możliwe bez cytoszkieletu komórki. Elektroporacja zaburza strukturę białek cytoszkieletu poprzez zmianę

ich konformacji i elektroforezę a przy tym powoduje obrzęk komórki i zmiany w stężeniu  $\text{Ca}^{2+}$  w cytozolu, co prowadzi do naprężeń a nawet naderwań sieci tych włóknistych struktur (33–35). Komórka, która regeneruje się po działaniu pola elektrycznego ma zwiększone zapotrzebowanie na energię, co może powodować wyczerpanie się ATP a to również wpływa niekorzystnie na polimeryzację włókien aktynowych (36). Na strukturę i funkcje cytoszkieletu wpływają też wytworzone przez działanie stresora wolne rodniki i aktywacja receptorów związanych z błoną komórkową. Skala tych zjawisk jest zależna od przyłożonego napięcia i w większości przypadków odwracalna, ponieważ cytoszkielet może się być odbudowany (37).

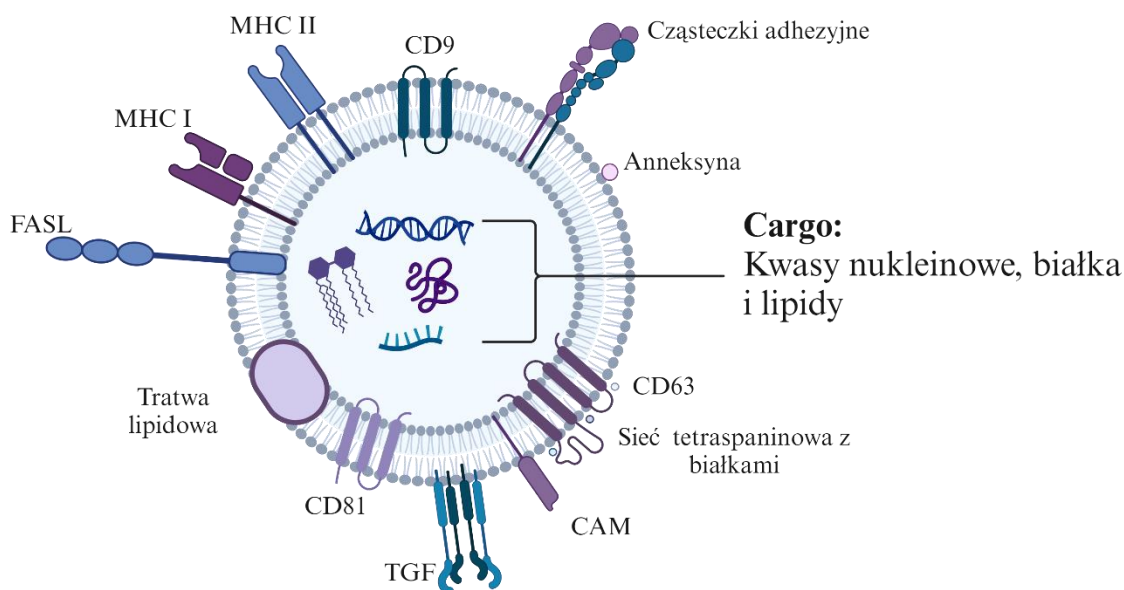
Jednym z łatwo dostrzegalnych efektów elektroporacji komórek adherentnych jest zmiana ich kształtu. Obserwowane pod mikroskopem komórki stają się bardziej zaokrąglone i często łatwiej odrywają się od dna naczynia hodowlanego. Jest to spowodowane częściowo obrzękiem komórek, ale również degradacją miejsc adhezyjnych (38). Zastosowanie impulsów elektrycznych wpływa również na połączenia międzykomórkowe i białka adhezyjne, co zmniejsza integralność utworzonej przez komórki monowarstwy (39,40). Patrząc przez pryzmat onkologii, wszelkie zmiany w połączeniach typu komórka-komórka mają krytyczne znaczenie w progresji i rokowaniach chorób nowotworowych. Osłabione połączenia sprzyjają migracji komórek i tworzenia nowych ognisk choroby, czyli przerzutów (41).

## 2.2 MIKROPEŁCHERZYKI POZAKOMÓRKOWE

W myśl idei i współczesnej interpretacji teorii komórkowej, „komórka jest podstawową jednostką strukturalną i funkcjonalną każdego organizmu”, praca tkanek, organów a ostatecznie całego ciała, zależy od zdolności tych pojedynczych komórek do skutecznego porozumiewania się (42). Komunikacja międzykomórkowa jest niezbędna do koordynowania złożonych procesów biologicznych, umożliwiając komórkom reagowanie na otoczenie, utrzymywanie homeostazy i wykonywanie wyspecjalizowanych funkcji. W mikroskopijnym świecie interakcji komórkowych istnieje sposób komunikacji wykraczający poza tradycyjne, znane od dziesięcioleci, metody, gdzie „wiadomość” jest przekazywana poprzez kontakt komórka-komórka dzięki bezpośredniej wymianie metabolitów czy wydzielanych do przestrzeni międzykomórkowej związków chemicznych. Mowa o mikropęcherzykach pozakomórkowych (ang. *Extracellular vesicles* - EVs), małych „nanokontenerach” jak to określiła prof. Zofia Bielańska-Osuchowska, które przez lata były rozpatrywane jako sposób komórki na pozbycie się zbędnych produktów przemiany materii czy zniszczonych fragmentów komórkowych (43). Dziś już wiemy, że stanowią one wyjątkowy sposób komunikacji na bliskie i dalekie odległości. Potwierdziły to badania, w których wykazano, że inne komórki pobierają EVs i je internalizują a ich zawartość ma działanie biologiczne (44,45).

### 2.2.1 Budowa i zawartość pozakomórkowych mikropęcherzyków

Termin „mikropęcherzyki pozakomórkowe” (EVs) został zaproponowany w 2011 r. a później poparty przez Międzynarodowe Towarzystwo Pęcherzyków Pozakomórkowych (ang. *International Society for Extracellular Vesicles* - ISEV) i odnosi się do heterogenicznej grupy uwalnianych przez komórki kulistych cząstek, które są ograniczone przez dwuwarstwową błonę biologiczną (46,47). Błona ta sprawia, że EVs są wyjątkowymi nośnikami – dzięki niej ładunek jest chroniony przed środowiskiem zewnętrznym przez co może być transportowany na dalekie odległości w organizmie. Zawiera ona też ważne białka, które są rozpoznawane przez komórkę-biorcę, umożliwiając EVs wniknięcie do jej wnętrza. Choć EVs powstają w różnych procesach komórkowych, mają wspólne białka błonowe, którymi są tetraspaniny CD9, CD63 oraz CD81 (48). Są one najczęściej oznaczanymi markerami potwierdzającymi obecność EVs w materiale biologicznym. Budowę EV i strukturę rozmieszczenia niektórych białek powierzchniowych ukazuje schemat (**Rycina 2**).

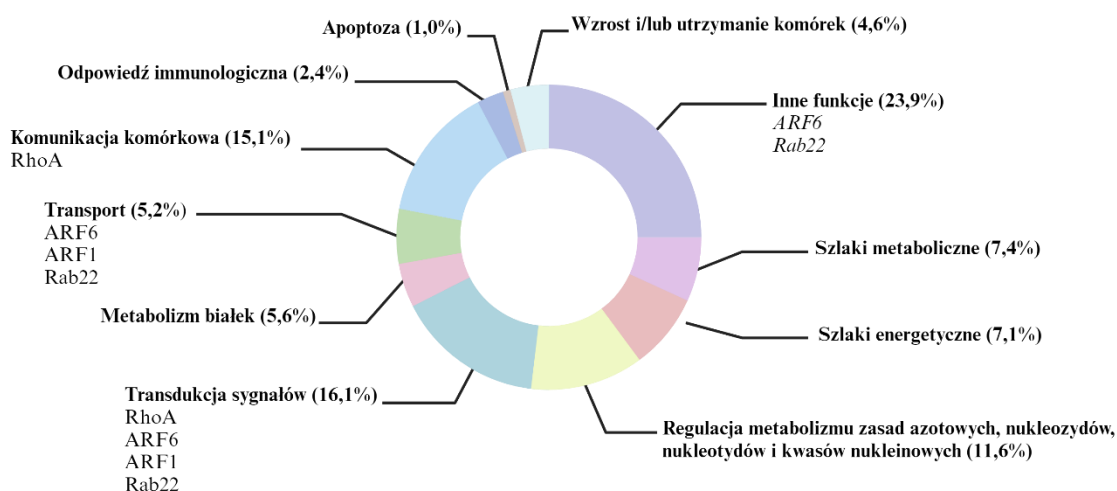


**Rycina 2** Struktura pozakomórkowego mikropęcherzyka z przykładowymi białkami powierzchniowymi i wewnętrznym cargo.

Ładunek, czyli tzw. cargo EVs różni się w zależności od ich rodzaju i biogenezy, ale zawsze odzwierciedla typ i stan fizjologiczny komórki, z której się wywodzi (43). Do tej pory przeprowadzono wiele badań, których celem było szczegółowe scharakteryzowanie zawartości EVs. Zaowocowały one stworzeniem publicznie dostępnych baz danych tj. Exocarta, Vesicpedia czy EVpedia (**Rycina 3**). Wiemy już, że wszystkie EVs zawierają w sobie różne białka, lipidy i kwasy nukleinowe. Na szczególną uwagę zasługuje cząsteczka RNA, która jest niezbędna do większości funkcji biologicznych a przy tym bardzo labilna. Wszystkie jej rodzaje są obecne we wnętrzu EV, transporterze wydaje się stworzonym do ochrony przed RNAzami tego delikatnego materiału genetycznego. Za pomocą różnych technik potwierdzono obecność nie tylko mRNA, miRNA i rRNA, ale również fragmenty tRNA czy długie i krótkie niekodujące RNA. Idąc tym tropem, można stwierdzić, że EVs mogą uczestniczyć w poziomym transferze genów w komórkach somatycznych (49). Jednak to, jak i ogólny wniosek, że EVs specyficznie i selektywnie transportują informacje biologiczne do innych komórek, opiera się w dużej mierze na przypuszczeniach i poszlakach (50). Choć udowodniono, że biorą udział w komunikacji międzykomórkowej, to sposób w jaki cząsteczki sygnałowe są pakowane do powstających pęcherzyków i jak regulowany jest ich transport do wyznaczonego miejsca, pozostaje nadal niewyjaśnione.

Szeroko opisywanym w naukowej literaturze podziałem EVs jest ten ze względu na wielkość cząsteczek i ich pochodzenie. Wyróżnia się trzy główne kategorie: egzosomy,

mikropęcherzyki i ciała apoptotyczne. Klasyfikacja ta jest jednak niedoskonała, ponieważ poszczególne podgrupy mikropęcherzyków pozakomórkowych zbyt często się „zazębiają”, co często uniemożliwia ich jednoznaczną identyfikację bez szeregu badań i analiz. Sama izolacja EVs z komórek czy supernatantu, jest procedurą daleką od idealnej, nie pozwala otrzymać w pełni jednolitego materiału. ISEV zaleca więc autorom prac badawczych posługiwanie się terminami, które jednoznacznie nie wskazują na egzosomy czy mikropęcherzyki, tylko opisują wielkość tych nanośników, np. małe/duże EVs (odpowiednio o mniejszej lub większej średnicy jak 100 nm), ich skład biochemiczny (obecność lub brak charakterystycznych antygenów różnicowania komórkowego) oraz pochodzenie. Na potrzeby tej pracy pozostaniemy przy podziale wyżej zaproponowanym nazewnictwie, ponieważ będzie to wystarczające do zrozumienia charakteru i celu przeprowadzonych badań.



**Rycina 3** Funkcje biologiczne cargo EVs zidentyfikowane w bazie danych Vesiclepedia. Zmodyfikowano na podstawie (81).

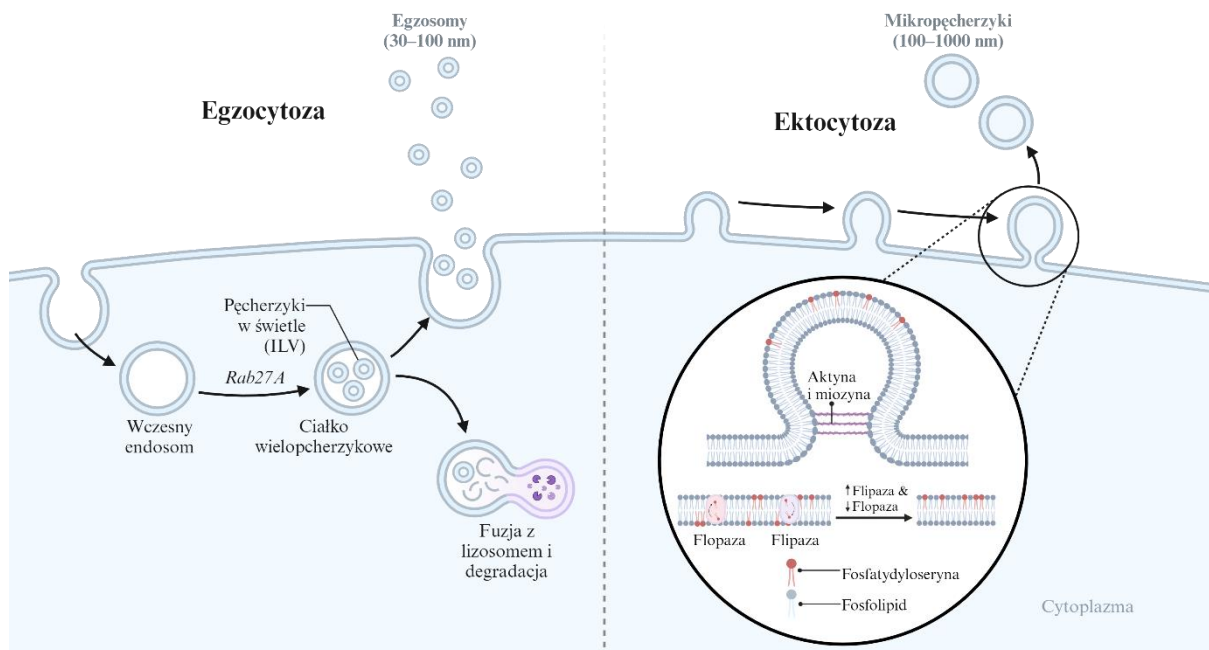
### 2.2.1.1 Egzosomy

Egzosomy (ang. *Exosomes* – EXs) to podtyp pozakomórkowych mikropęcherzyków o średnicy 30-100 nm, które są wydzielane przez komórki do przestrzeni międzykomórkowej. Główną cechą odróżniającą je od innych EVs to ich biogeneza, która jest złożonym, wieloetapowym procesem zachodzącym we wnętrzu komórki, w który zaangażowany jest kompleks białkowy ESCRT (ang. *Endosomal sorting Complex Required for Transport*). Pierwszy etap obejmuje wpuklenie się błony komórkowej do światła komórki i utworzenie wczesnych endosomów, które następnie dojrzewają do późnych endosomów nazywanych również ciałkami wielopęcherzykowymi (ang. *Multivesicular body* – MVB), poprzez szereg etapów dojrzewania, które obejmują zmiany w ich składzie i funkcji. W obrębie MVBs część błony endosomalnej zaczyna pączkować w liczne pęcherzyki nazywane ILV (ang. *Intraluminal Vesicle*) do których jest selektywnie ładowane cargo. Gdy MVB są w pełni uformowane i zawierają ILV, ulegają fuzji z błoną plazmatyczną komórki i następuje uwalnianie pęcherzyków, od tego momentu nazywanych już egzosomami (51).

### 2.2.1.2 Mikropęcherzyki

Rozmiar mikropęcherzyków (ang. *Microvesicles* – MVEs), zwanych także ektosomami czy mikrocząsteczkami, waha się zazwyczaj w granicach od 100 do 1000 nm (52). Jednakże, w przeciwieństwie do EXs, MVEs powstają w wyniku bezpośredniego pączkowania z błony komórkowej, nie mają one górnego limitu wielkości i mogą mieć średnicę nawet kilku mikronów (53). Tworzenie MVEs jest odpowiedzią komórki na bodźce pochodzące z środowiska wewnętrznego i zewnętrznego, które powodują przepływ jonów  $Ca^{2+}$ , aktywację kinaz białkowych i miejscowe zmiany w błonie komórkowej związane z redystrybucją fosfolipidów i fosfatydyloseryny dzięki flipazom i flopazom a w konsekwencji skurczem białek cytoszkieletu i uformowaniem mikropęcherzyka (54) (Rycina 4). Dowodem na brak przypadkowości tworzenia MVEs jest charakter jego błony, która, mimo że jest fragmentem plazmolemy komórki, różni się od niej składem (55). Dodatkowo ważną informacją stanowi fakt, że we wnętrzu MVEs mogą znajdować się małe organelle oraz inne składniki cytoplazmy komórki tj. białka czy nawet enzymy (56).





**Rycina 4** Biogeneza egzosomów (EXs) i mikropęcherzyków (MVs). Zmodyfikowano na podstawie (57)

### 2.2.1.3 Ciałka apoptotyczne

Ciałka apoptotyczne (ang. *Apoptotic Bodies* - ApoBDs) są małymi, błonowymi fragmentami komórek powstającymi w wyniku procesu apoptozy, czyli zaprogramowanej śmierci komórki. W trakcie apoptozy komórka przechodzi przez charakterystyczne zmiany morfologiczne, takie jak kondensacja chromatinu, fragmentacja jądra komórkowego, obkurczanie się komórki oraz reorganizacja cytoszkieletu. Na jej końcowym etapie, komórka dzieli się na mniejsze fragmenty, czyli ApoBDs. Ich rozmiar jest relatywnie niewielki, zwykle o średnicy od 0,5 do 2  $\mu\text{m}$ , podobny do płytek krwi. Jak inne EVs, są one otoczone podwójną warstwą lipidową, która chroni zawarte w nich komponenty przed rozlaniem się do środowiska zewnętrznego.

### 2.2.2 Uwalnianie EVs i dystrybucja

Wytworzone przez komórki EVs trafiają do przestrzeni międzykomórkowej, później do światła naczyń krwionośnych i limfatycznych, gdzie są biernie transportowane i docierają do odległych miejsc w organizmie. Samo uwalnianie EVs jest szybkie i związane z cytozolowym stężeniem jonów wapniowych oraz aktywacją kinaz komórki „rodzicielskiej” (54). Jest to proces nieustanny, ale wpływ mają na niego różnego rodzaju procesy patologiczne jak stan zapalny czy rozwój nowotworu – wtedy pula krążących w organizmie EVs się zwiększa (58). EVs mogą być pobierane przez komórkę docelową poprzez łączenie się z jej błoną w procesie endocytozy, fagocytozy lub poprzez fuzję. Interakcja może nastąpić również na zasadzie przylegania poprzez połączenie receptorów plazmolemmy komórki docelowej z rozpoznany ligandem na powierzchni EVs lub przez cząsteczki adhezji komórkowej (ang. *Cell adhesion molecules* - CAMs) (59). Wszystkie te opisane procesy wymagają nakładów energii. W jednej tej samej komórce internalizacja EVs może zachodzić równocześnie i na wiele różnych sposobów. Udowodniono w badaniach *in vitro*, że potrzeba mniej jak 30 minut, aby EVs z przestrzeni międzykomórkowej trafiły do wnętrza komórek, gdzie są wykrywalne przez minimum 24 godziny (60). Po przedostaniu się do środka komórki docelowej, EVs stają się częścią systemu transportu śródkomórkowego – swoje cargo mogą uwalniać po połączeniu się z błonami endosomów biorcy lub bezpośrednio do cytozolu, przyczyniając się do aktywacji różnych szlaków biologicznych (61).

### 2.2.3 EVs a rozwój i progresja nowotworu

Wiedząc, że EVs są częścią wielkiej machinerii jaką jest komunikacja międzykomórkowa, zrozumienie roli tych pęcherzyków może rzucić światło na patogenezę wielu chorób, w tym nowotworowych. Wydzielane przez komórki guza, wpływają na rozwój nie tylko innych komórek nowotworowych, ale również na całą niszę, czyli mikrośrodowisko komórek nowotworowych na które składa się przede wszystkim macierz zewnątrzkomórkowa (ang. *Extracellular matrices* - ECM) oraz okoliczne komórki nienowotworowe, ale związane z guzem (ang. *Tumor-associated cells* - TAC): fibroblasty, mezenhymalne komórki macierzyste, komórki śródbłonna krwi, komórki śródbłonna limfatycznego oraz komórki układu odpornościowego.

Możemy wyróżnić trzy główne mechanizmy działania EVs związane z progresją nowotworu (62):

1. Oddziaływanie EVs z komórkami układu odpornościowego.
2. Wpływ dostarczanego przez EVs cargo (głównie w postaci miRNA, mRNA i białek).
3. Udział EVs jako mediatorów w procesach inwazji, przerzutowania i lekooporności.

Aktywność immunomodulacyjna EVs obejmuje m.in. supresję odpowiedzi zarówno komórkowej jak i humoralnej. Mają zdolność indukowania apoptozy i jednocześnie hamowania proliferacji limfocytów T poprzez znajdujące się na EVs ligandy FasL i TNF oraz regulację szlaku PI3K/AKT, (prowadzą do defosforylacji AKT, zwiększając ekspresję proapoptotycznego BAX i zmniejszając Bcl-2, Bcl-xL i MCL-1) (63). Przyczyniają się też do polaryzacji makrofagów związanych z guzem (ang. *Tumor-associated macrophages* - TAMs) czego efektem jest promowanie rozrostu nowotworu i upośledzają funkcjonowanie komórek NK wpływając negatywnie na ekspresję receptora NKG2D, który jest kluczowy dla zabijania komórek nowotworowych (64,65). Ponadto EVs wykazują ekspresję CD39 i CD73, co prowadzi do produkcji znanej cząsteczki immunosupresyjnej, adenozy (ADO), a w konsekwencji do niepohamowanego postępu choroby nowotworowej (66). Takie kompleksowe i wielokierunkowe działanie EVs na komórki układu odpornościowego powodują, że zarówno komórki nowotworowe jak i TAC „uciekają” spod nadzoru

immunologicznego, uniemożliwiając tym samym pełną odpowiedź organizmu na obecność nowotworu.

EVs mają również zdolność „przeprogramowywania” komórek docelowych, ponieważ w swoim cargo posiadają różne kwasy nukleinowe. Analiza proteomiczna EVs potwierdziła, że mikropęcherzyki pozakomórkowe przenoszą również takie protoonkogeny jak KRAS czy zmutowany EGFR, które powodują niekontrolowany wzrost komórek nowotworowych (67,68). Również mikropęcherzykowa metaloproteinaza MMP3 przekazywana jest innym komórkom co przyczynia się do promowania migracji i inwazji komórek nowotworowych (69). LncRNA obecne w EVs wpływają na angiogenezę guza oraz zwiększoną adhezję komórek śródbłonna, co również jest złym rokowaniem (70,71). Podobnie nadeskpresja mikropęcherzykowego miR-92q pochodzącego z komórek nowotworowych wpływa na komórki śródbłonna, powodując ich migrację i zapoczątkowywanie nowych naczyń krwionośnych (72).

Pochodzące z guza EVs biorą udział niemal w każdym etapie inwazji komórek nowotworowych i tworzenia przerzutów. Mają zdolność pobudzania proliferacji poprzez aktywację fosforylacji Akt czy wydzielanie białek szoku cieplnego (ang. *Heat shock proteins*, HSP) oraz surwiwiny. Podobnie wspierają aktywną i ukierunkowaną migrację, podobną do diapedezy leukocytów, komórek nowotworowych przez tkanki poprzez wydzielanie EVs na „czele” komórki, które destabilizują okoliczne struktury tkankowe i elementy macierzy pozakomórkowej tj. kolagen, lamina i fibronektyna (73,74). Co ciekawe, sama migracja EVs w organizmie i wydzielane przez nich interleukiny powodują, na zasadzie chemotaksji, rekrutację komórek nowotworowych do odleglejszych narządów a nawet węzłów chłonnych (75,76).

Wpływ EVs pochodzących z guza na inne komórki, szczególnie te związane z niszą nowotworu jak komórki endotelialne czy fibroblasty, został udowodniony w wielu pracach i ma równie duże znaczenie w progresji nowotworu co wpływ na same komórki nowotworowe. EVs nie tylko mogą pobudzać do waskularyzacji mikrośrodowiska ale również potrafią „rozszczelnić” naczynia krwionośne, co zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia przerzutów, poprzez uwalnianie takich białek jak SERPINA1, SERPINF2 czy MMP9 (74). Cargo EVs zawiera również czynniki wzrostu tj. FGF, TGF- $\beta$  i VEGF, które powodują ekspansję całej niszy (77).

EVs pochodzące z komórek nowotworowych również mają swój udział w ich lekooporności. Potrafią „wyłapywać” krążące cząsteczki chemioterapeutyku i przetransportować w odleglesze miejsca przez co jego realne stężenie w mikrośrodowisku guza jest mniejsze (75,76). Część EVs, które są internalizowane przez komórki docelowe, jest degradowana razem z lekiem przez lizosomy. Wreszcie same EVs, ze względu na receptory, ligandy i inne białka powierzchniowe, wykazują podobieństwo molekularne z komórkami nowotworowymi z których pochodzą, przez co same stają się celem leków, pośrednio chroniąc tym samym komórki guza (78). Potwierdzono też, że EVs pośredniczą również w transferze lekooporności do wrażliwych na leki komórek nowotworowych (79,80). Za pośrednictwem przenoszonej przez nich glikoproteiny P (P-gp, MDR-1 lub ABCB1) lub kodującej jej RNA, przyczyniając się do powstawania nowych pomp aktywnie usuwających cząsteczki leków, zapobiegając tym samym jego akumulacji we wnętrzu komórek nowotworowych.

### 3 CEL I ZAŁOŻENIA PRACY

---

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu konwencjonalnej elektroporacji na profil uwalnianych mikropęcherzyków (MVEs) u komórek nowotworowych i prawidłowych.

W toku prowadzonych eksperymentów określono następujące cele szczegółowe:

**Cel szczegółowy nr. 1:** Analiza wpływu elektroporacji na integralność błon komórkowych i transport dwukierunkowy u komórek linii A375, Me45 oraz HaCaT.

**Cel szczegółowy nr. 2:** Weryfikacja skuteczności wirowania sekwencyjnego jako metody izolacji mikropęcherzyków oraz potwierdzenie obecności MVEs w supernatancie elektroporowanych komórek.

**Cel szczegółowy nr. 3:** Ocena ilościowa i jakościowa mikropęcherzyków pozyskanych od komórek poddanych elektroporacji z użyciem pola elektrycznego o natężeniu 800, 1200 oraz 1600 V/cm.

**Cel szczegółowy nr. 4:** Zbadanie wpływu wyizolowanych MVEs na zdolności proliferacyjne i migracyjne innych komórek czerniaka i keratynocytów.

**Cel szczegółowy nr. 5:** Analiza zmian ekspresji wybranych białek powierzchniowych i aktywności enzymów biorących udział w procesach adhezji i migracji komórkowej pod wpływem badanych MVEs.

Spodziewanym efektem realizowanych badań było opracowanie metod umożliwiających wyizolowanie i scharakteryzowanie mało poznanej podgrupy mikropęcherzyków pozakomórkowych (EVs) jakimi są MVEs. Dotychczas nie podjęto wielu badań skupiających się na tym rodzaju struktur, szczególnie w połączeniu z elektroporacją. Obecnie, w kontekście badań naukowych, znaczna część społeczności naukowej skupia się na badaniu egzosomów, najmniejszych nam znanych EVs. W odpowiedzi na potrzebę głębszego zrozumienia pełnego przekroju mikropęcherzyków pozakomórkowych, niniejsza praca koncentruje się na MVEs, co pozwoli uzupełnić luki w obecnej wiedzy na temat mikropęcherzyków, szczególnie tych pochodzących z „leczonych” elektroporacją komórek nowotworowych.

Podjęte w ramach pracy badania przyczynią się do rozwoju skuteczniejszych i przede wszystkim bezpieczniejszych dla pacjenta metod leczenia nowotworów dzięki zrozumieniu wpływu impulsów elektrycznych stosowanych w elektroporacji i elektrochemioterapii na komunikację międzykomórkową na poziomie molekularnym oraz na różne procesy związane z progresją chorób onkologicznych.

## 4 MATERIAŁY I METODY

---

### 4.1 MATERIAŁY

Do doświadczeń użyto następujących linii komórkowych:

- A375 – komórki czerniaka ludzkiego
- Me45 – komórki czerniaka ludzkiego
- HaCaT – keratynocyty naskórka

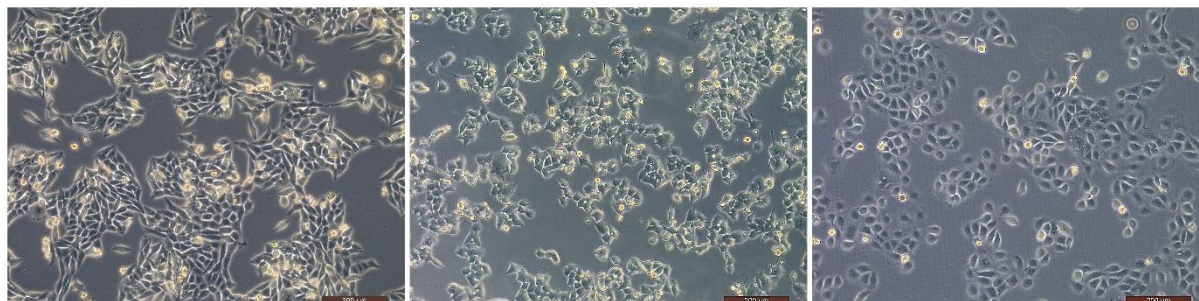
Linia A375 to linia komórkowa o morfologii nabłonkowej, która została wyizolowana z guza pierwotnego 54-letniej pacjentki z czerniakiem złośliwym skóry. Komórki tej linii są adherentne i przyjmują kształt wielokątny lub wrzecionowaty, wykazują również stosunkowo szybkie tempo wzrostu, z czasem podwojenia wynoszącym około 24 godziny. Cechą charakterystyczną tej linii jest obecność klinicznie istotnej mutacji BRAF Val600Glu. Komórki nowotworowe posiadające ten gen produkują zmutowaną formę białka BRAF, które wpływa na szlak sygnałowy kinazy MAP, prowadząc do jego nadaktywności. Efektem tego jest niekontrolowany podział i wzrost komórek, co przekłada się na obraz kliniczny – początek choroby charakteryzuje się agresywnym przebiegiem. Potwierdzenie obecności mutacji BRAF u pacjentów onkologicznych umożliwia zastosowanie leków celowanych, czyli inhibitorów BRAF.

Komórki linii Me45 pochodzą od 35-letniego pacjenta chorującego na czerniaka złośliwego. Zostały one pobrane z guza przerzutowego umiejscowionego w węźle chłonnym. Charakteryzują się morfologią nabłonkową jako komórki wielokątne, z tendencją do tworzenia gęstych monowarstw w hodowli *in vitro* a ich czas wzrostu jest umiarkowany – czas podwojenia liczby komórek wynosi między 24 a 48 godzin w optymalnych warunkach.

Linia HaCaT to samoistnie unieśmiertelniona linia komórkowa keratynocytów ludzkich, prawidłowych komórek dominujących w naskórku, które nabyły zdolność do nieograniczonej proliferacji bez wprowadzania do nich genów wirusowych czy onkogenów. Komórki zostały pozyskane od 62-letniego pacjenta. w warunkach *in vitro* tworzą gęste monowarstwy a ich kształt jest zbliżony do sześciangu.



Linie komórkowe A375 i Me45 wybrano jako reprezentatywne modele ludzkiego czerniaka, podczas gdy komórki HaCaT wybrano jako reprezentatywne dla prawidłowych ludzkich keratynocytów, co umożliwia analizę porównawczą między komórkami



**Fotografia 1** Komórki linii A375, Me45 oraz HaCaT (od lewej). Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu odwróconego (Leica) przy powiększeniu 5-krotnym.

nowotworowymi i normalnymi. Wszystkie linie zaprezentowano poniżej (Fotografia 1).

Linie komórkowe A375 oraz HaCaT zostały pozyskane z banku komórek ATCC® (ang. *American Type Culture Collection*) i dostarczone w formie zamrożonej. Linia komórkowa Me45 została podarowana przez Pracownię Radiobiologii Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie w Gliwicach, gdzie została wyprowadzona i scharakteryzowana w 1997 r.

#### **4.1.1 Hodowla komórkowa**

Opisane powyżej linie komórkowe hodowano w takich samych, standardowych warunkach (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) w inkubatorze w pożywce DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (*Sigma-Aldrich*) wzbogaconej o 10% FBS (*Gibco*), 1% L-glutaminę, 1% penicylinę i streptomycynę (*Sigma-Aldrich*). Medium hodowlane było zmieniane na świeże średnio raz na dwa dni, do czasu osiągnięcia 80-90% konfluencji. Komórki pasażowano za pomocą roztworu 0,25% trypsyny-EDTA (*Thermo Fisher Scientific*), odpłukiwano w pożywce, odwirowywano (5 min, 1500 RPM) w wirówce Centrifuge 5430 R (*Eppendorf*) i przenoszono do nowej butelki hodowlanej w ilości zapewniającej ich optymalny wzrost i rozwój. Ilość komórek określano pod mikroskopem świetlnym odwróconym CKX41 (*Leica*) na płytkach Kova (*KOVA® Glasstic Slide 10 with Grid Chamber, HYCOR*).

O ile nie wskazano inaczej, we wszystkich doświadczeniach komórki czerniaka i keratynocyty hodowano w wyżej opisanej pożywce.

Wszystkie linie komórkowe były regularnie testowane pod kątem zakażenia mykoplazmą przy użyciu zestawu MycoBlue Mycoplasma Detector (*Vazyme*). Do eksperymentów używano komórek, które były w fazie wzrostu logarytmicznego wykładniczego, aby były fizjologicznie jednolite i o wysokiej żywotności dla odzwierciedlenia normalnych funkcji komórkowych.

## 4.2 METODY

### 4.2.1 Warunki elektroporacji

We wstępnych testach żywotności i wpływu kalceiny, komórki z grupy badanej poddano ekspozycji na pole elektromagnetyczne przy użyciu systemu do elektroporacji obejmującego elektroporator BTX ECM 830 (*BTX Harvard Apparatus, Syngen Biotech,*) oraz specjalistyczne kuwety o rozmiarze szczeliny 4 mm (*VWR International*). w przypadku pozostałych eksperymentów używano elektrody kontaktowej The Petri Pulser™ 2 mm (*BTX Harvard Apparatus, Syngen Biotech,*), przeznaczonej do elektroporacji komórek adherentnych *in situ*. Parametry ekspozycji (natężenie pola elektrycznego, liczba impulsów, czas ich trwania i częstota) zostały dobrane na podstawie dostępnych danych literaturowych i standardowych procedur ESOPE. Dla zachowania optymalnych i powtarzalnych warunków elektroporacji komórki były przepłukiwane sterylnym buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) bez jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  oraz buforem do elektroporacji.

We wszystkich eksperymentach użyto buforu do elektroporacji składającego się z: 10 mM HEPES (*Sigma-Aldrich*), 250 mM sacharoza (*Chempur*), 1 mM  $\text{MgCl}_2$  (*Sigma-Aldrich*) rozpuszczonych w wodzie MilliQ.

### 4.2.2 Test żywotności i proliferacji - wpływ elektroporacji na komórki

Aby ocenić aktywność enzymatyczną procesów utleniania i redukcji, świadczących pośrednio o ilości komórek, dla każdej linii komórkowej został wykonany test z użyciem odczynnika PrestoBlue™, roztworu na bazie resazuryiny (*Thermo Fisher Scientific*). Komórki linii A375, Me45 oraz HaCaT zawieszano w stężeniu  $1 \times 10^6$  kom/mL w 300  $\mu\text{l}$  buforu do EP i elektroporowano w kuwetach 4mm a następnie wysiewano na czarne płytki 96-dołkowe z przezroczystym dnem w ilości  $2,5 \times 10^5$  komórek/dołek by po 24 i 72 godzinach dodać odczynnik PrestoBlue™ rozpuszczony według zaleceń producenta w medium hodowlanym w stosunku 1:10. Po 10-minutowej inkubacji (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ) mierzono poziom fluorescencji przy długości fali 590-615 nm na czytniku GloMax Discover (*Promega*). Otrzymane wyniki analizowano według poniższego wzoru:

$$\% \text{ żywotności} = \frac{\text{średnia wartość fluorescencji komórek poddanych EP}}{\text{średnia wartość fluorescencji komórek kontrolnych}} \times 100\%$$

Istotność statystyczną wyznaczono jednoczynnikową analizą wariancji (test ANOVA) oraz testem Dunnetta.

### 4.2.3 Badanie wydajności elektroekstrakcji

Aby ocenić jak elektroporacja wpływa na integralność błon komórkowych i dwukierunkowy transport przezbłonowy zbadano wydajność wypływu kalceiny z elektroporowanych komórek dwoma niezależnymi metodami.

Acetoksymetylokalceina (kalceina AM) (*Sigma-Aldrich*) to związek, który wnika do wnętrza żywych komórek bez naruszania ich błony komórkowej. w cytoplazmie jest hydrolizowany przez wewnątrzkomórkowe esterazy i przekształcany w fluorescencyjną kalceinę. Elektroekstrakcję kalceiny oceniano na podstawie spadku średniej intensywności zielonej fluorescencji (ang. *Green Image Mean – GIM*) badanych komórek.

#### 4.2.3.1 Analiza fluorescencji z wykorzystaniem systemu Incucyte®

Elektroekstrakcja kalceiny została określona ilościowo przy pomocy systemu Incucyte® (*Sartorius*) do obrazowania żywych komórek w czasie rzeczywistym. Komórki linii A375, Me45 oraz HaCaT wysiano na 6-dołkowe płytki w ilości  $2 \times 10^5$  komórek/dołek i pozostawiono w inkubatorze na noc. Następnego dnia usunięto medium hodowlane, komórki przemyto dwukrotnie sterylnym PBS i dodano DMEM z kalceiną, której końcowe stężenie wynosiło 2  $\mu$ M. Komórki barwiono przez godzinę w inkubatorze. Po tym czasie pozostałości kalceiny wraz z supernatantem usunięto a komórki trzykrotnie przepłukano roztworem PBS i raz buforem do elektroporacji. Elektroporacja została wykonana przy użyciu elektrody kontaktowej Petri Pulser™ a HEPES odciągnięto i dodano pożywkę hodowlaną. Płytki z komórkami przeniesiono do urządzenia Incucyte®, które znajdowało się w inkubatorze dla zachowania optymalnych warunków. Szacunkowy czas potrzebny na przygotowanie komórek od momentu dostarczenia komórkom impulsów elektrycznych do rozpoczęcia pomiarów wynosił nie więcej niż 10 minut. Wypływ kalceiny był monitorowany w czasie rzeczywistym na przestrzeni dwóch godzin a średnią intensywność fluorescencji mierzono automatycznie co 20 minut.

#### 4.2.3.2 Cytometria przepływowa

Aby wybarwić komórki kalceiną, odciągnięto pożywkę i komórki przepłukano dwukrotnie PBS. Do naczynia hodowlanego dodano świeżego medium zawierającego kalceinę w stężeniu 2  $\mu$ M. Po godzinnej inkubacji komórki ostrożnie poddano trypsynizacji, zwirowano (5 min, 2000 RPM) i zawieszono w buforze do elektroporacji. Gęstość komórek w kuwecie do elektroporacji wynosiła  $2 \times 10^6$  komórek/mL. Po dostarczeniu impulsów elektrycznych komórki ponownie zwirowano i zawieszono w PBS. Sygnał zielonej fluorescencji pochodzącej od kalceiny obecnej w komórkach oceniano przy użyciu cytometru

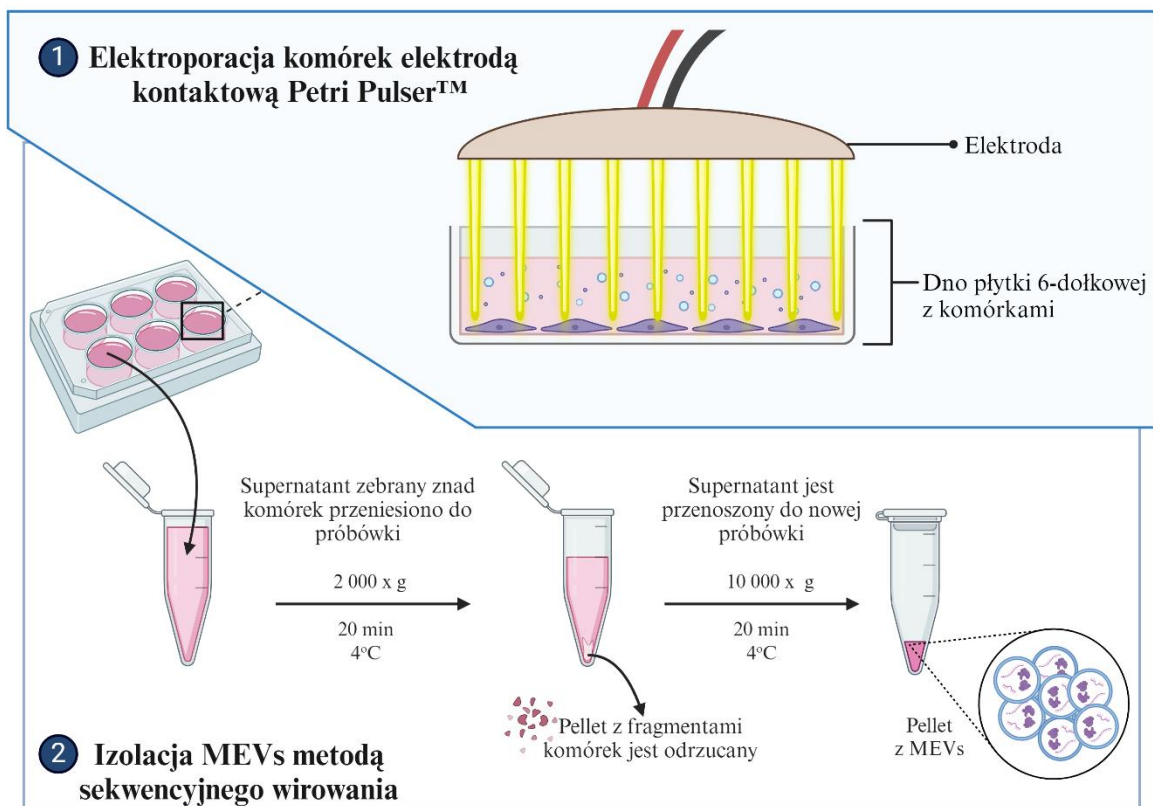
przepływowego CyFlow CUBE-6 (*Sysmex*). Fluorescencję kalceiny mierzono przy użyciu lasera wzbudzającego o długości fali  $\lambda=488$  nm, a wykrywano detektorem FL-1 ( $\lambda=525/50$  nm).

#### 4.2.4 Izolacja mikroęcherzyków (MVEs)

Procedura izolacji MVEs opierała się na metodzie sekwencyjnego wirowania, która została zaproponowana przez dr Federikę Felicetti z pominięciem ostatniego etapu, czyli ultrawirowania (81).

W procedurze izolacji mikroęcherzyków użyto medium hodowlanego w którego składzie znajdowała się specjalistyczna surowica bydłęca wolna od egzosomów (Gibco).

Komórki w pierwszej kolejności wysiewano na płytce 6-dołkowej (Coring) w ilości  $1 \times 10^6$  komórek/dołek. Następnego dnia komórki elektroporowano elektrodą kontaktową i po dodaniu medium hodowlanego przenoszono do inkubatora na 24 godziny. Pierwszy etap izolacji obejmował wstępne wirowanie supernatantu w probówkach typu Eppendorf ( $2000 \times g$ ; 20 min;  $4^\circ\text{C}$ ) celem pozbycia się pozostałości komórkowych. Następnie supernatant przenoszono do czystych probówek i powtórnie wirowano ( $10\,000 \times g$ ; 20 min;  $4^\circ\text{C}$ ). Uzyskany w ten sposób pellet zawierał pożądane MVEs, który następnie zawieszano w sterylnym PBS lub DMEM. Schemat ilustrujący izolację MVEs znajduje się poniżej (Rycina 5).



Rycina 5 Proces izolacji MVEs z supernatantu elektroporowanych komórek.

Wart podkreślenia jest fakt, że do wszystkich dalszych eksperymentów były używane świeżo izolowane mikropęcherzyków, materiał biologiczny nie był zamrażany.

#### **4.2.5 Weryfikacja mikropęcherzyków pozakomórkowych przy użyciu testu ELISA**

Aby potwierdzić, że materiał wyizolowany podczas sekwencyjnego wirowania to rzeczywiście MVEs, wykonano test immunoenzymatyczny (ELISA) przy użyciu zestawu Human CD63 ELISA Kit (*ThermoFisher Scientific*). CD63 to glikoproteina z rodziny tetraspanin powszechnie występująca na powierzchni pęcherzyków wydzielniczych różnych typów komórek, w tym mikropęcherzyków pozakomórkowych.

Z każdej próbki zawierającej MVEs wykonano podwójną próbę, zawiesin nie rozcieńczano. Badane próbki, standardy i kontrole przeniesiono do dołków na płytce pokrytej przeciwciałem specyficznym dla ludzkiego CD63 i poddano całonocnej inkubacji w temperaturze 4°C, aby umożliwić związanie CD63 z przeciwciałem. Dołki przemywano trzykrotnie dostarczonym buforem do przemywania, aby usunąć niezwiązany materiał. Następnie do wszystkich dołków dodano biotynyłowane przeciwciało dla CD63. Tak przygotowaną płytkę inkubowano w 37°C przez godzinę. Po ponownym przemyciu dołków buforem dodano koniugat streptawidyny-HRP, a następnie roztwór substratu i pozostawiono reakcję do rozwoju w ciemności przez 30 minut. Reakcję zatrzymano za pomocą roztworu przerywającego reakcję dostarczonego w zestawie.

Absorbancję mierzono przy długości fali  $\lambda=450$  nm za pomocą czytnika mikropłytek GloMax Discover (*Promega*). Otrzymane wartości odczytywano względem krzywej wzorcowej uzyskanej na podstawie użytych standardów o wzrastającym stężeniu CD63. Stężenie białka wyrażono w pg/mL.

#### **4.2.6 Obrazowanie mikropęcherzyków przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM)**

Celem potwierdzenia obecności oraz określenia morfologii wyizolowanych mikropęcherzyków, zastosowano transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM).

Wyizolowane mikropęcherzyki utrwalano w 2,5% buforowanym glutaraldehydzie o pH 7,2 i kontrastowano z 2% tetratlenkiem osmu w ciemności przez 2 godziny. Po tym czasie komórki przemyto buforem i kontrastowano z 2% octanem uranylu przez 12 godzin. Następnego dnia próbki przeprowadzono przez alkoholowy szereg odwadniający i zatapiano w żywicy epoksydowej. Po polimeryzacji przygotowano ultracienkie sekcje na ultramikrotomie (*Leica*). Tak przygotowane skrawki o grubości 60 nm umieszczono na

siatkach miedzianych (400 Mesh). Obrazowanie wykonano przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEM-F200 (*Jeol*). MVEs obserwowano przy różnych powiększeniach (np. w zakresie od 10 000× do 100 000×), aby ocenić ich rozmiar, kształt i morfologię powierzchni.

Obrazy uzyskane z TEM analizowano przy użyciu programu ImageJ, aby zmierzyć średnicę MVEs i ocenić ich ultrastrukturę. Wybrano reprezentatywne obrazy do włączenia do rozprawy, aby zademonstrować rozmiar i cechy morfologiczne wyizolowanych mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

#### **4.2.7 Ocena ilościowa i jakościowa mikropęcherzyków**

##### **4.2.7.1 Cytometria przepływowa**

Cytometria przepływowa została użyta do pomiaru rozkładu wielkości i ilości MVEs wyizolowanych z supernatantu znanego elektroporowanych komórek. Analizę przeprowadzono przy użyciu cytometru przepływowego CytoFLEX (*Beckman Coulter*) wyposażonego w niebieskie ( $\lambda=488$  nm) i fioletowe ( $\lambda=405$  nm) lasery jako źródła wzbudzenia.

Przed główną analizą cytometr przepływowy został skalibrowany przy użyciu mieszanki kulek referencyjnych ApogeeMix (*Apogee Flow Systems Inc.*). ApogeeMix składa się z kulek krzemionkowych o średnicach 180, 240, 300, 590, 880 i 1300 nm, wraz z zielonymi fluorescencyjnymi kulkami polistyrenowymi o średnicy 110 nm. Te kulki kalibracyjne mają współczynnik załamania światła podobny do współczynnika cząstek biologicznych, co zapewnia dokładne określanie rozmiaru MVEs. Kalibrację przeprowadzono w celu ustalenia bramek wielkości i zapewnienia precyzji pomiaru.

MVEs wyizolowano zgodnie z procedurą opisaną w sekcji *Izolacja mikropęcherzyków*. Aby umożliwić ich wykrywanie metodą cytometrii przepływowej, wykonano dodatkowy etap barwienia. Pellety zawierające MVEs zawieszono w 50  $\mu$ l PBS i barwiono kalceiną-AM (stężenie końcowe związku to 2  $\mu$ M). Mikrocząstki inkubowano przez 30 minut w 37°C, umożliwiając barwnikowi wniknięcie do wnętrza nanocząstek. Po tym czasie dodawano 450  $\mu$ l PBS. Próbkę trzymano na lodzie i chroniono przed działaniem światła widzialnego.



Przeprowadzono dwa rodzaje analiz:

#### 4.2.7.1.1 - Analiza rozkładu wielkości MVEs:

Dla każdej próbki zarejestrowano  $10^4$  zdarzeń w celu określenia rozkładu wielkości mikropęcherzyków przy szybkości przepływu  $2 \mu\text{L}/\text{min}$ , aby zminimalizować ich agregację. Bramki wielkości zdefiniowano na podstawie kalibracji z kulkami ApogeeMix, co umożliwiło kategoryzację mikropęcherzyków według zakresów wielkości.

#### 4.2.7.1.2 - Analiza ilościowa MVEs:

Liczba MVEs została określona ilościowo w stałej objętości  $5 \mu\text{l}$ . Oszacowano zmiany w stężeniu mikropęcherzyków przy różnych parametrach elektroporacji i w różnych punktach czasowych po izolacji.

Dane analizowano przy użyciu oprogramowania CytExpert, wersja 2.6 (*Beckman Coulter*), gdzie rozkład wielkości obliczono na podstawie danych kalibracyjnych. Określono procent mikropęcherzyków w każdej kategorii wielkości, a całkowitą liczbę MVEs znormalizowano do objętości próbki, aby umożliwić ilościowe porównania między różnymi warunkami. Wykorzystanymi testami statystycznymi była jednoczynnikowa analiza wariancji i test Dunetta.

#### 4.2.7.2 *Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)*

Do oceny rozkładu wielkości MVEs wyizolowanych z kondycjonowanej pożywki komórek A375 zastosowano dynamiczne rozpraszanie światła laserowego (DLS). DLS jest szeroko stosowaną techniką pomiarową służącą do charakteryzowania wielkości cząstek w zawiesinie i umożliwia analizę cząstek w zakresie wielkości od  $0,3 \text{ nm}$  do  $10\,000 \text{ nm}$ . Jest ona odpowiednia do analizy i charakterystyki nanocząstek takich jak mikropęcherzyki pozakomórkowe. Technika ta opiera się na ruchach Browna cząstek - oznacza to, że cząstki, które są mniejsze poruszają się szybciej, podczas gdy większe wolniej. Światło rozproszone przez MVEs zawiera informacje o szybkości dyfuzji, a tym samym o rozkładzie ich wielkości. Pomiary wykonano przy użyciu analizatora Zetasizer Nano ZS (*Malvern Instruments*), wyposażonego w laser He-Ne o  $\lambda=633 \text{ nm}$  i kącie detekcji  $173^\circ$  (tryb rozpraszania wstecznego). MVEs wyizolowano metodą wirowania sekwencyjnego opisaną w podrozdziale *Izolacja mikropęcherzyków*, które następnie zawieszono w  $1 \text{ mL}$  w PBS. Próbkę dokładnie wymieszano metodą aspiracyjną w celu usunięcia agregatów przed analizą i pozostawiono do osiągnięcia przez nich temperatury pokojowej. Do pomiarów użyto kuwet

polistyrenowych (*Sarstedt*) o pojemności 4,2 mL. Dla każdej próbki wykonano co najmniej trzy pomiary, przy czym każdy z nich składał się z 15 serii 10-sekundowych akwizycji. Analizę danych przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Zetasizer (wersja 3.3, *Malvern Instruments*), które oblicza średnicę hydrodynamiczną (średnia *Z*) i wskaźnik polidispersyjności (PDI) na podstawie intensywności rozproszonego światła.

#### **4.2.8 Testy żywotności i proliferacji - wpływ MVEs na komórki**

Aby ocenić wpływ mikropęcherzyków na wzrost i rozwój komórek badanych linii, wyizolowano MVEs wg. procedury przedstawionej w podrozdziale *Izolacja mikropęcherzyków pozakomórkowych*. W międzyczasie nasadzono komórki na czarne płytki 96-dołkowe z przezroczystym dnem w ilości  $2,5 \times 10^5$  komórek/dołek. Następnego dnia wymieniono medium hodowlane znad komórek na świeże i wraz z nim dodano wyizolowane MVEs. Po 72 godzinach wykonano test PrestoBlue™, aby ocenić jak wzbogacone o MVEs medium wpłynęło na zdolność proliferacyjną komórek. Dane otrzymane po odczytaniu fluorescencji analizowano według poniższego wzoru.

$$\% \text{ żywotności} = \frac{\text{średnia wartość fluorescencji traktowanych EVs komórek}}{\text{średnia wartość fluorescencji komórek kontrolnych}} \times 100\%$$

##### **4.2.8.1 Test zarastania ran do oceny migracji i proliferacji komórek**

Przeprowadzono test gojenia ran w celu oceny wpływu izolowanych MVEs na zdolność migracyjną i proliferacyjną komórek linii A375, Me45 oraz HaCaT. Badanie to monitoruje zamykanie się przerwy wolnej od komórek w czasie jako wskaźnik migracji i proliferacji komórek.

Komórki przeznaczone do izolacji z nich MVEs zostały wysiane w ilości  $1 \times 10^6$  komórek/dołek i poddane EP elektrodą kontaktową zgodnie z opisem w rozdziale *Warunki elektroporacji*. Po 24 godzinach zebrano supernatant znad komórek, a MVEs zostały wyizolowane zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale *Izolacja mikropęcherzyków pozakomórkowych*. w międzyczasie przygotowano 24-dołkową płytkę (*Coring*) z przyklejonymi na dnie dołków silikonowymi insertami (*Ibidi*) które wypełniono zawiesiną komórek o gęstości  $3-7 \times 10^5$  w zależności od linii komórkowej, aby utworzyły one na dnie studzienki monowarstwę. Po 24-godzinnej inkubacji inserty zostały ostrożnie odklejone dzięki czemu utworzyła się 500 nm przerwa pomiędzy przyklejonymi komórkami. Wyizolowane MVEs zawieszono w świeżym medium i dodano do komórek. Kontrolę stanowiły komórki bez dodatku mikropęcherzyków. Zamykanie się rany monitorowano, wykonując zdjęcia mikroskopem CKX41 (*Leica*) co 4 godziny.

Procent zamknięcia rany obliczono jako funkcję czasu za pomocą oprogramowania ImageJ/Fiji wyposażonego we wtyczkę Wound Healing Size Tool. Początkowy obszar rany ( $t=0$ ) i pozostały obszar rany w każdym punkcie czasowym zostały skwantyfikowane, a procent zamknięcia rany obliczono w następujący sposób:

$$\% \text{ zarośnięcia ran} = \frac{\text{początkowe pole powierzchni rany} - \text{pole powierzchni rany w czasie } t}{\text{początkowe pole powierzchni rany}} \times 100\%$$

Do celów statystycznych wykorzystano dwukierunkową analizę wariancji (ANOVA) z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego.

#### 4.2.8.2 Analiza impedancji przy użyciu systemu RTCA-iCELLigence™

Analiza komórek w czasie rzeczywistym (ang. *real-time cell analysis - RTCA*) oparta na pomiarze impedancji została przeprowadzona w celu oceny wpływu MVEs na proliferację i zachowanie komórek linii A375, Me45 i HaCaT. System RTCA-iCELLigence™ (ACEA Biosciences, Inc.) został użyty do ciągłego monitorowania zmian impedancji komórkowej, czyli przepływu elektronów i jonów na powierzchni czujników, który jest zależny od zmian właściwości komórek i koreluje z ich przeżywalnością, liczebnością, morfologią oraz stopniem adhezji. Zmiana impedancji wyrażana jest jako wartość indeksu komórkowego (ang. *Cell Index - CI*) i definiuje się ją jako

$$CI = \frac{Z_i - Z_0 \Omega}{15 \Omega}$$

gdzie  $Z_0$  jest oporem tła dołka mierzoną dla samego medium hodowlanego, a  $Z_i$  jest oporem mierzonym w dowolnym czasie ( $t$ ) przy obecności komórek.

Komórki wysiano na płytkę E-Plate (ACEA Biosciences) w ilości  $2 \times 10^4$  komórek/dołek. Następnie płytkę umieszczono w systemie RTCA-iCELLigence™ w inkubatorze, a pomiary impedancji rozpoczęto w celu zarejestrowania wartości bazowych indeksu komórkowego (CI). Po ustaleniu jego stabilnego poziomu, do dołków na płytkach dodano wyizolowane mikropęcherzyki. Kontrolę stanowiły komórki, które niepoddano działaniu MVEs. System RTCA-iCELLigence™ stale monitorował indeks komórkowy (CI) w 15 minutowych odstępach czasowych przez 96 godzin.

Dane analizowano przy użyciu oprogramowania RTCA Software Pro (ACEA Biosciences). Wartości indeksu komórkowego normalizowano do odczytu bazowego

wykonanego przed dodaniem MVEs, aby uwzględnić wszelkie początkowe różnice w gęstości wysiewu komórek. Wyniki przedstawiono na wykresie jako indeks komórkowy (CI) w funkcji czasu, aby porównać wpływ MVEs na zachowanie komórek w porównaniu z warunkami kontrolnymi.

#### **4.2.8.3 Oznaczanie całkowitej kinazy adhezji ogniskowej (FAK) za pomocą testu ELISA**

Aby oznaczyć ilość całkowitej kinazy ogniskowo-adhezyjnej (ang. *Focal Adhesion Kinase* - FAK) w komórkach, które były inkubowane przez 48h z wyizolowanymi MVEs, wykorzystano zestaw Human FAK (Total) ELISA Kit (*ThermoFisher Scientific*). FAK jest kinazą tyrozynową zaangażowaną w regulację adhezji komórek, migracji i sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, a jej aktywność jest powiązana z rozwojem nowotworów, inwazją i przerzutami.

Komórki z płytki ściągnięto za pomocą skrobaczek do kultur komórkowych a następnie wykonano ich lizaty według instrukcji producenta. Wszystkie próbki analizowano w dwóch powtórzeniach, a lizaty nie były rozcieńczane. Próbki, przygotowane standardy i kontrole przeniesiono do dołków na płytce pokrytej przeciwciałem wychwytyującym i dodano przeciwciało specyficzne dla FAK, a następnie inkubowano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej, aby umożliwić wiązanie białka z przeciwciałem. Po zakończeniu inkubacji dołki przemywano buforem dołączonym do zestawu, usuwając niezwiązane białka. Następnie dodano wyznakowane drugorzędowe przeciwciało sprzężone z peroksydazą chrzanową (HRP), a płytkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po ponownym przemyciu dołków dodano stabilizowany chromogen. Reakcję pozostawiono do rozwinięcia w ciemności przez 30 minut, po czym zatrzymano ją za pomocą roztworu przerywającego, dołączonego do zestawu.

Absorbancję mierzono przy długości fali  $\lambda=450$  nm za pomocą czytnika mikropłytek GloMax Discover (Promega). Wyniki porównano z krzywą kalibracyjną utworzoną na podstawie standardów o znanym stężeniu FAK. Ostateczne stężenie FAK w próbkach wyrażono w ng/mL. Otrzymane dane poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji (test ANOVA) i testem Dunetta.

#### **4.2.8.4 Oznaczanie poziomów E-kadheryny i N-kadheryny metodą cytometrii przepływową**

W celu oznaczenia poziomów ekspresji E-kadheryny (CD324) oraz N-kadheryny (CD325) w próbkach komórkowych zastosowano cytometrię przepływową, wykorzystując przeciwciała sprzężone z fluorochromami oraz cytometr BD FACSCanto (*Becton Dickinson*).

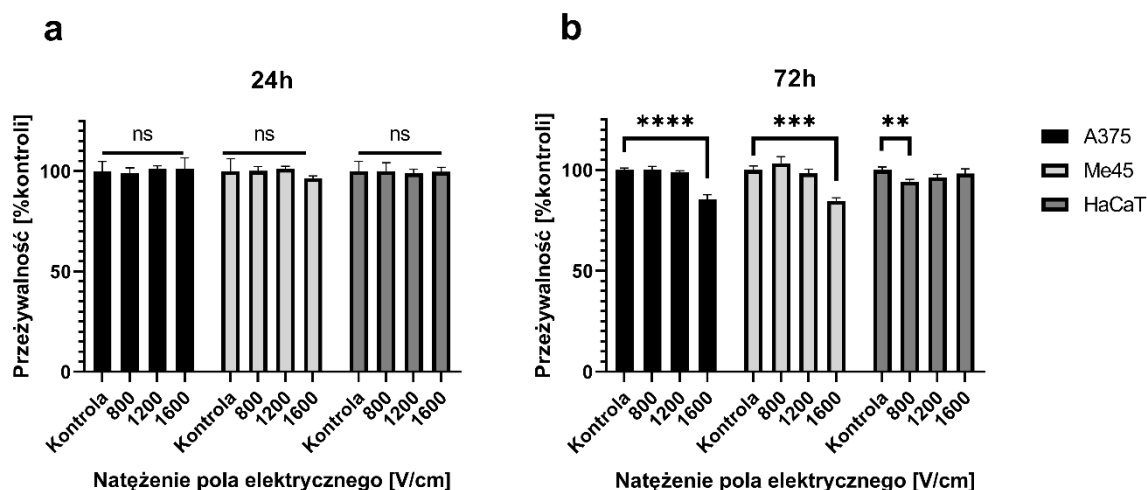
Ekspresję N-kadheryny oznaczono za pomocą przeciwciała skierowanego przeciwko ludzkiemu CD325 (*BioLegend*), natomiast ekspresję E-kadheryny oznaczono przy użyciu przeciwciała przeciwko ludzkiemu CD324 (*BioLegend*).

Próbki komórkowe poddano procesowi inkubacji z odpowiednimi przeciwciałami w celu związania specyficznych epitopów na powierzchni komórek. w przypadku przeciwciała anty-N-kadheryna (CD325) sprzężonego z PE (fikoerytryną), użyto lasera o  $\lambda=488$  nm, a do przeciwciała anty-CD324 sprzężonego z APC (allofikocyjaniną) użyto lasera o  $\lambda=633$  nm. w celu detekcji fluorescencji odpowiednich fluorochromów wykorzystano dedykowane kanały dla PE ( $\lambda=585/42$  nm) oraz APC ( $\lambda=660/20$  nm). Uzyskane dane analizowano z użyciem oprogramowania BD FACSDiva, co pozwoliło na ilościową ocenę poziomu ekspresji obu kadheryn w badanych próbkach. Istotność statystyczną w odniesieniu do komórek kontrolnych danej linii wyznaczono jednoczynnikową analizą wariancji (test ANOVA) i testem Dunnetta.

## 5 WYNIKI

### 5.1 TEST ŻYWOTNOŚCI I PROLIFERACJI - WPŁYW ELEKTROPORACJI NA KOMÓRKI

Przeżywalność komórek linii A375, Me45 i HaCaT była mierzona za pomocą testu PrestoBlue® po 24 i 72 godzinach od zastosowania elektroporacji. Komórki poddano działaniu 8 impulsów elektrycznych, przy czym każdy trwał 100  $\mu$ s a częstotliwości powtarzania wynosiła 1 Hz. Do eksperymentów wybrano następujące natężenia pola elektrycznego: 800, 1200 oraz 1600 V/cm. Celem przeprowadzonych badań było potwierdzenie wykonania odwracalnej elektroporacji, czyli takiej, przy której przeżywalność komórek wynosiła nie mniej niż 80% w porównaniu do niepoddanych działaniu pola elektrycznego komórek, które stanowiły kontrole.



**Rycina 6** Przeżywalność komórek linii A375, Me45 i HaCaT wyznaczono testem PrestoBlue® po 24 (a) i 72 godzinach (b) od zastosowania elektroporacji wyrażona jako procent komórek kontrolnych. Słupki błędów to  $\pm$  SD dla  $n=3$ . Istotność statystyczną w odniesieniu do komórek kontrolnych danej linii wyznaczono jednoczynnikową analizą wariancji (test ANOVA) i testem Dunnetta, gdzie \*\* statystycznie istotne dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\* dla  $p = 0,001$  i \*\*\*\* dla  $p \leq 0,001$ .

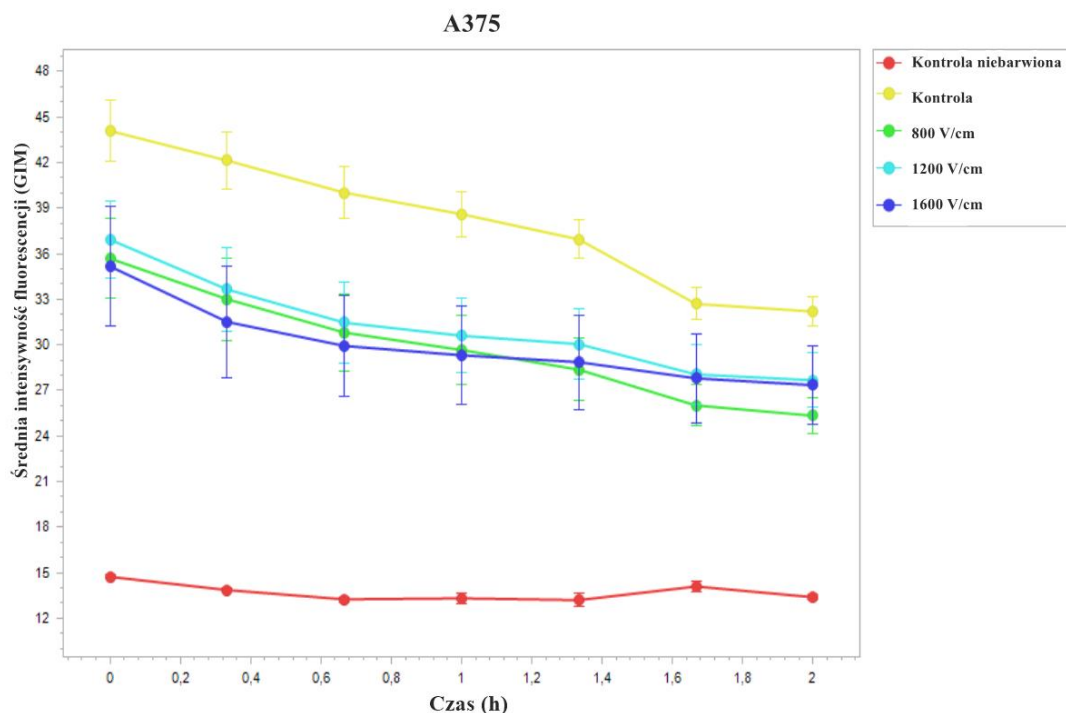
Po 24 godzinach od EP przeżywalność linii A375 wyniosła kolejno:  $99,11 \pm 2,47\%$  (800 V/cm);  $101,26 \pm 1,81\%$  (1200 V/cm);  $101,12 \pm 6,44\%$  (1600 V/cm) (**Rycina 6a**). Dla linii Me45:  $100,17 \pm 2,11\%$  (800 V/cm);  $101,09 \pm 1,33\%$  (1200 V/cm);  $96,48 \pm 1,19\%$  (1600 V/cm). Dla linii HaCaT:  $99,90 \pm 4,32\%$  (800 V/cm);  $98,89 \pm 2,06\%$  (1200 V/cm);  $99,72 \pm 2,19\%$  (1600 V/cm). Różnice w przeżywalności pomiędzy kontrolą a zastosowanymi parametrami elektroporacji nie były istotne statystycznie. Analiza wykonana 72 godziny od EP ujawniła, iż przeżywalność linii A375 wyniosła następująco:  $100,28 \pm 2,17\%$  (800 V/cm);

99,01 ± 0,36% (1200 V/cm); 85,41 ± 0,39% (1600 V/cm) (**Rycina 6b**). Dla linii Me45: 103,36 ± 2,38% (800 V/cm); 98,38 ± 2,12% (1200 V/cm); 84,76 ± 1,41% (1600 V/cm). Z kolei dla linii HaCaT: 94,29 ± 1,12% (800 V/cm); 96,35 ± 1,49% (1200 V/cm); 98,25 ± 2,31% (1600 V/cm). Zastosowane parametry nie spowodowały większego niż o 17,24% (linia A375, parametr 1600 V/cm) spadku przeżywalności u wszystkich badanych linii komórkowych, potwierdzając tym samym wykonanie elektroporacji odwracalnej.

## 5.2 BADANIE WYDAJNOŚCI ELEKTROEKSTRAKCJI

### 5.2.1 Analiza fluorescencji z wykorzystaniem systemu Incucyte®

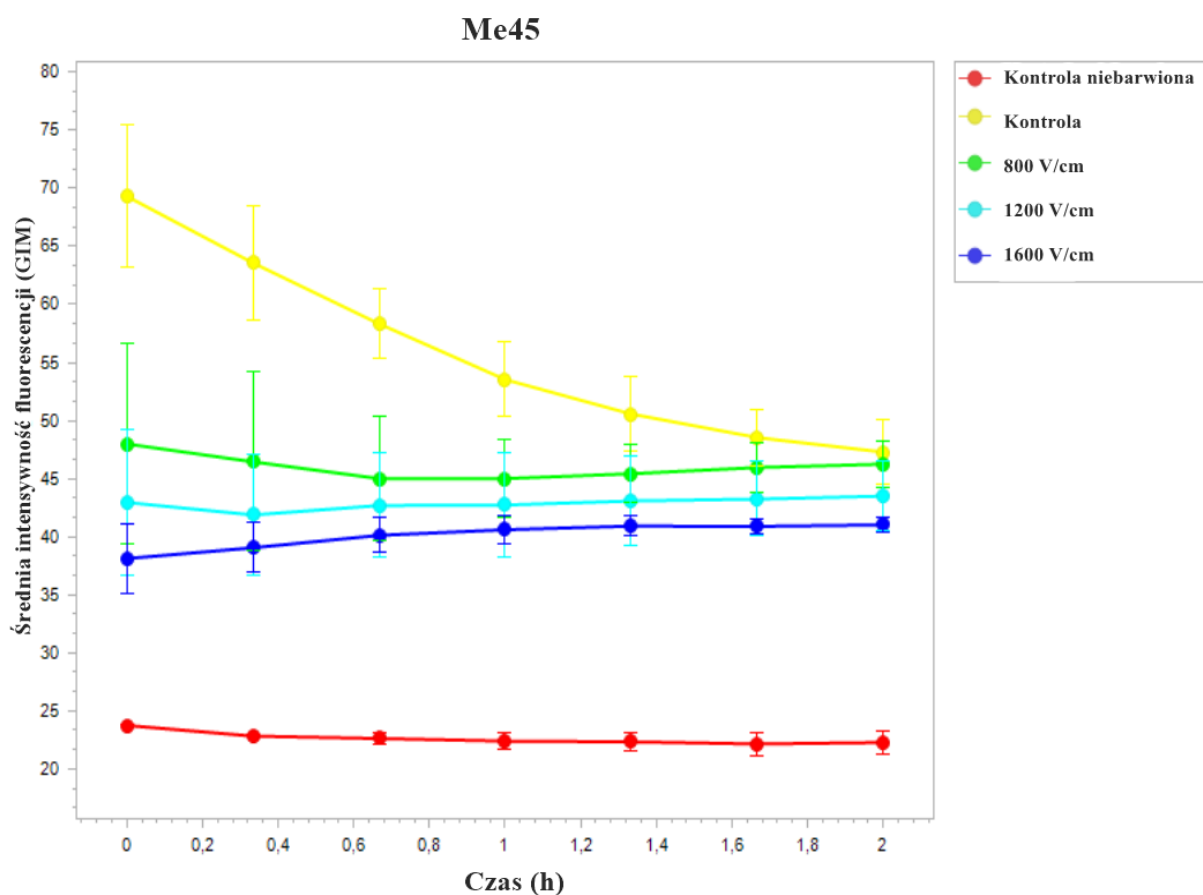
W celu obserwacji, jak pole elektryczne działające na komórkę nowotworową wpływa na jej transport odkomórkowy, wykonano elektroporację. Wybarwione kalceiną komórki poddano EP przy użyciu różnych natężeń pola elektrycznego (800 V/cm, 1200 V/cm i 1600 V/cm), zgodnie z protokołem ESOPE, a następnie monitorowano przez 2 godziny, używając systemu do przyżyciowego obrazowania komórek Incucyte®. Zmiany wartości średniej intensywności fluorescencji (ang. *Green Image Mean – GIM*) odczytywano co 20 minut. Spadek fluorescencji odpowiada uwalnianiu kalceiny z cytozolu komórki, co wskazuje na permabilizację błony komórkowej.



**Rycina 7** Analiza wydajności elektroporacji kalceiny z komórek linii A375 po zastosowaniu impulsów elektrycznych. Kontrolę stanowią komórki nieelektroporowane.

W przypadku komórek linii A375 obserwuje się stopniowy spadek intensywności fluorescencji przy wszystkich zastosowanych parametrach elektroporacji (**Rycina 7**). Kontrola (tj. komórki niepoddane działaniu EP) wykazuje stopniowy spadek fluorescencji w czasie trwania eksperymentu, co odpowiada naturalnemu uwalnianiu barwnika. Natomiast, komórki wystawione na działanie zewnętrznych impulsów elektrycznych wykazują wyraźniejsze obniżenie sygnału fluorescencji, przy czym wyższe przyłożone napięcie pola elektrycznego koreluje ze zwiększonym uwalnianiem zielonej kalceiny. W sytuacji zastosowania parametrów 800 i 1200 V/cm średnia intensywność fluorescencji szybko maleje w ciągu pierwszej godziny, po czym stabilizuje się w granicach 30-32 GIM. Przy najwyższym stosowanym napięciu obserwuje się podobną tendencję, jednak intensywność fluorescencji pozostaje nieco niższa w porównaniu do pozostałych parametrów.

W komórkach linii Me45 uwalnianie fluorescencyjnej kalceiny jest mniej intensywne w porównaniu z pozostałymi badanymi liniami komórkowymi, przy czym wszystkie warunki EP wykazują bardziej stopniowy spadek sygnału (**Rycina 8**).

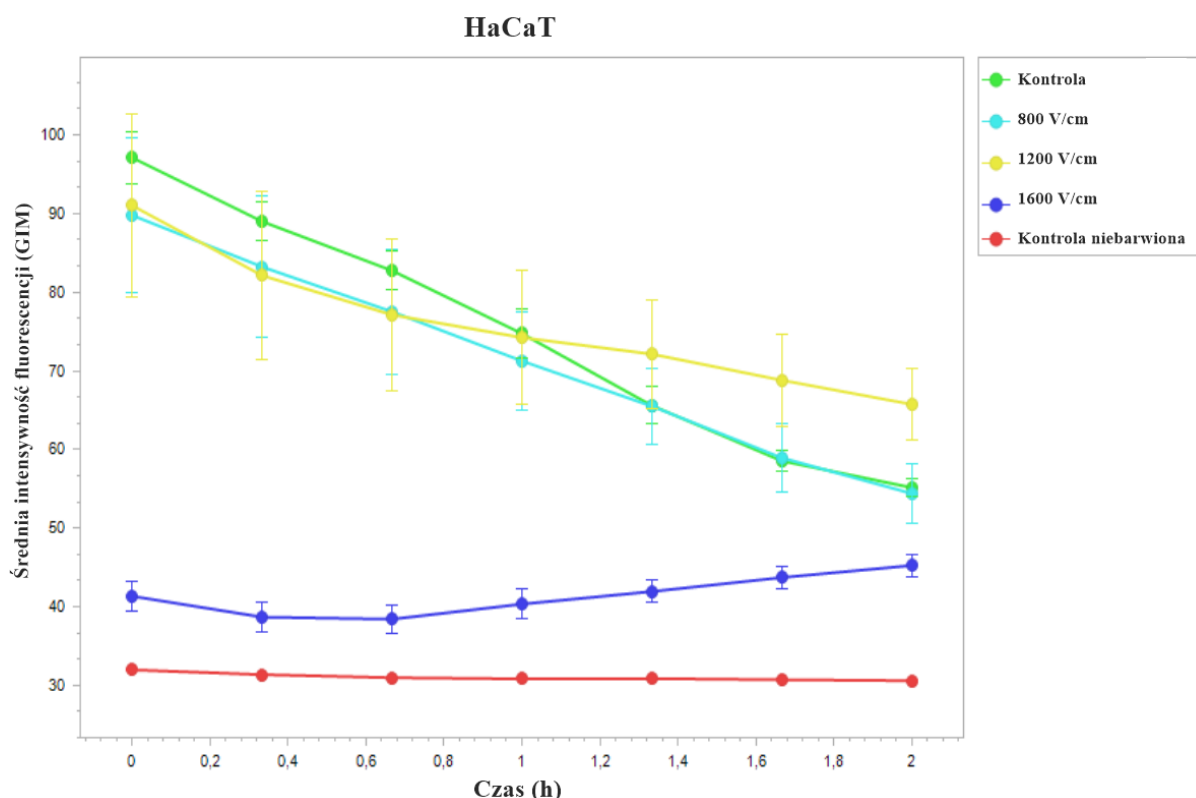


**Rycina 8** Analiza wydajności elektroekstrakcji kalceiny z komórek linii Me45 po zastosowaniu impulsów elektrycznych. Kontrolę stanowią komórki nieelektroporowane.



Widoczne stałe obniżenie intensywności fluorescencji u komórek kontrolnych utrzymuje się na wysokim poziomie przez cały 2-godzinny okres obserwacji. Zastosowanie parametrów 800 i 1200 V/cm skutkowało znacząco niższą wartością odczytanej fluorescencji kalceiny w porównaniu do komórek kontrolnych. Efekt ten sugeruje prawdopodobne uwalnianie kalceiny na skutek permeabilizacji dwuwarstwy lipidowej spowodowanej przyłożonym napięciem. W przypadku najwyższego zastosowanego (1600 V/cm) obserwuje się najniższą wartość fluorescencji, która utrzymuje się w czasie trwania eksperymentu. Wskazuje to na najsilniejszy wpływ tego protokołu EP na intensywność permeabilizacji błony komórkowej

Dla linii komórkowej HaCaT zaobserwowano podobny trend uwalniania kalceiny z komórek grupy kontrolnej oraz tych, u których zastosowano parametry 800 i 1200 V/cm (**Rycina 9**). Najwyższe badane natężenie pola elektrycznego (1600 V/cm) powoduje natychmiastową i niemal całkowitą utratę barwnika fluorescencyjnego przez komórki, bliską wartości jaką prezentują komórki niebarwione (41 i 32 GIM).

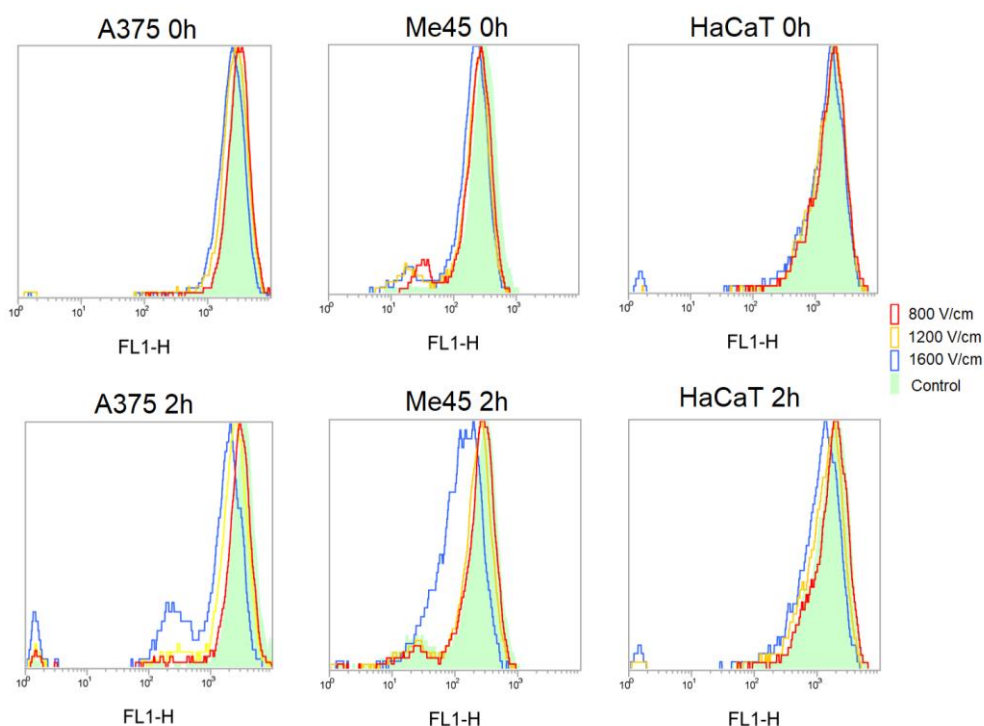


**Rycina 9** Analiza wydajności elektroekstrakcji kalceiny z komórek linii HaCaT po zastosowaniu impulsów elektrycznych. Kontrolę stanowią komórki nieelektroporowane.

Zaprezentowane dane wskazują, że odwracalna elektroporacja powoduje uwalnianie przez komórki kalceiny a efekt jest zależy od zastosowanego napięcia. Zgodnie z przewidywaniami, wyższe napięcia prowadzą do zwiększonej permabilizacji błony komórkowej, o czym świadczy redukcja sygnały pochodzącego od barwnika fluorescencyjnego.

### 5.2.2 Cytometria przepływowa

W celu potwierdzenia wcześniej otrzymanych wyników dokonano pomiaru wewnątrzkomórkowej fluorescencji kalceiny dokonano przy pomocy cytometrii przepływowej. Poniższe histogramy ukazują intensywność fluorescencji dla badanych linii komórkowych: A375, Me45 oraz HaCaT. Odczyty zostały wykonane w dwóch punktów pomiarowych: czas 0 oraz 2 godziny od zastosowania impulsów elektrycznych, przy różnych napięciach pola elektrycznego (800, 1200 i 1600 V/cm) (**Rycina 10**).



**Rycina 10** Histogramy obrazujące efektywność elektroekstrakcji tuż po zastosowaniu elektroporacji (górny rząd) oraz 2 godziny później (dolny rząd). Kontrolę stanowiły komórki nie poddane działaniu pola elektrycznego.

Linia A375 wykazuje spadek intensywności fluorescencji bezpośrednio po zaaplikowaniu zewnętrznych impulsów elektrycznych. W szczególności przy parametrze 1600 V/cm, co wskazuje na uwolnienie kalceiny przez utworzone w błonie komórkowej pory. Warunki 800 oraz 1200 V/cm wskazują nieznacznie mniejszą zmianę w fluorescencji, co sugeruje mniejszą permabilizację błony komórkowej. Po dwóch godzinach od wykonanej EP

histogramy spadek intensywności sygnału fluorescencji, co potwierdza postępujące uwalnianie kalceiny z komórki.

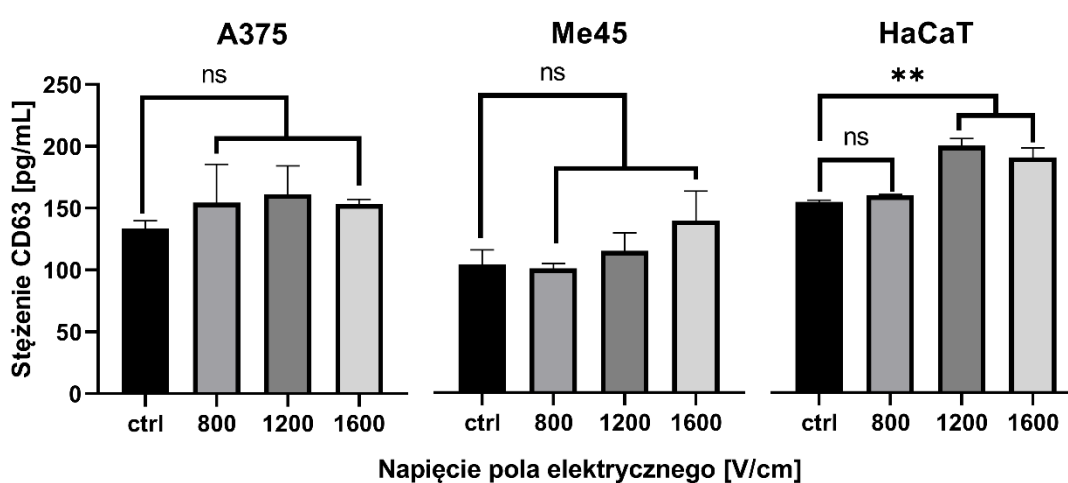
Podobnie, jak w przypadku linii A375, u elektroporowanych komórek linii Me45 zauważalne jest zmniejszenie intensywności fluorescencji tuż po zastosowaniu impulsów elektrycznych w porównaniu do kontroli. Histogramy obrazujące 2 godzinę eksperymentu ukazują, że natężenie pola elektrycznego o wartości 1600 V/cm powoduje największy spadek intensywności fluorescencji komórek. W przypadku pozostałych parametrów, sygnał utrzymuje się na podobnym poziomie jak u komórek w grupie kontrolnej.

Keratynocyty, porównywalnie do komórek czerniaka, również wykazują największy spadek intensywności fluorescencji po zastosowaniu najwyższego parametru. Różnice te jednak są najmniejsze, szczególnie w przypadku pomiaru po 2 godzinach od EP.

Dane uzyskane zarówno dzięki systemowi IncuCyte®, jak i cytometrii przepływowej ukazują wyraźną tendencję do zwiększania uwalniania kalceiny z badanych komórek wraz ze wzrostem przyłożonego napięcia. Oba eksperymenty wykazały również, że komórki poszczególnych linii wykazują różną wrażliwość na impulsy elektryczne.

### 5.3 WERYFIKACJA MIKROPEŁCZERZYKÓW POZAKOMÓRKOWYCH PRZY UŻYCIU TESTU ELISA

Analiza ilościowa cząsteczki CD63, tetraspaniny powszechnie stosowanej jako marker pozakomórkowych mikropełcherzyków, została wykonana testem immunoenzymatycznym ELISA. Przedstawione na wykresach wartości ukazują jaka ilość białka CD63 została zmierzona w próbkach zawierających MVEs wyizolowanych z supernatantu  $1 \times 10^6$  komórek po 24 godzinach od ekspozycji na zewnętrzne impulsy elektryczne (**Rycina 11**). Głównym celem przeprowadzonego badania było potwierdzenie obecności w próbkach cząsteczek



**Rycina 11** Średnie stężenia markera CD63 w próbkach zawierających MVEs wyizolowane z elektroporowanych komórek linii A375, Me45 oraz HaCaT. Kontrole stanowiły MVEs pochodzące z komórek nieelektroporowanych. Słupki błędów to  $\pm$  SD dla  $n=2$ . Istotność statystyczną w odniesieniu do komórek kontrolnych danej linii wyznaczono jednoczynnikową analizą wariancji (test ANOVA) i testem Dunnetta, gdzie \*\* statystycznie istotne dla  $p \leq 0,01$ .

CD63 pozytywnych.

W przypadku linii A375, pomimo, iż różnice nie są istotne staty, można zauważyć wzrost stężenia markera CD63 we wszystkich trzech badanych parametrach elektroporacji (800, 1200 i 1600 V/cm) w porównaniu do kontroli. Stężenia białka wyniosły kolejno:  $154,38 \pm 31,04$ ;  $161,23 \pm 23,11$  i  $153,22 \pm 4,07$  pg/mL. Podobna sytuacja ma miejsce dla linii Me45 – nieznaczny wzrost stężenia jest widoczny, lecz nie ma on statystycznego znaczenia. Stężenia CD63 wyniosły kolejno:  $100,45 \pm 4,07$ ;  $114,72 \pm 14,65$  i  $139,36 \pm 23,61$  pg/mL.

W przeciwieństwie do linii komórek czerniaka, linia keratynocytów HaCaT wykazuje statystycznie istotny wzrost stężenia badanego markera w przypadku parametrów 1200 oraz 1600 V/cm i wyniosły odpowiednio  $199,71 \pm 5,74$  oraz  $190,40 \pm 7,60$  pg/mL. Stężenie

cząsteczki CD63 w próbkach pochodzących od komórek, które były poddane działaniu pola elektrycznego o natężeniu 800 V/cm wynosiło  $159,58 \pm 0,66$  pg/mL.

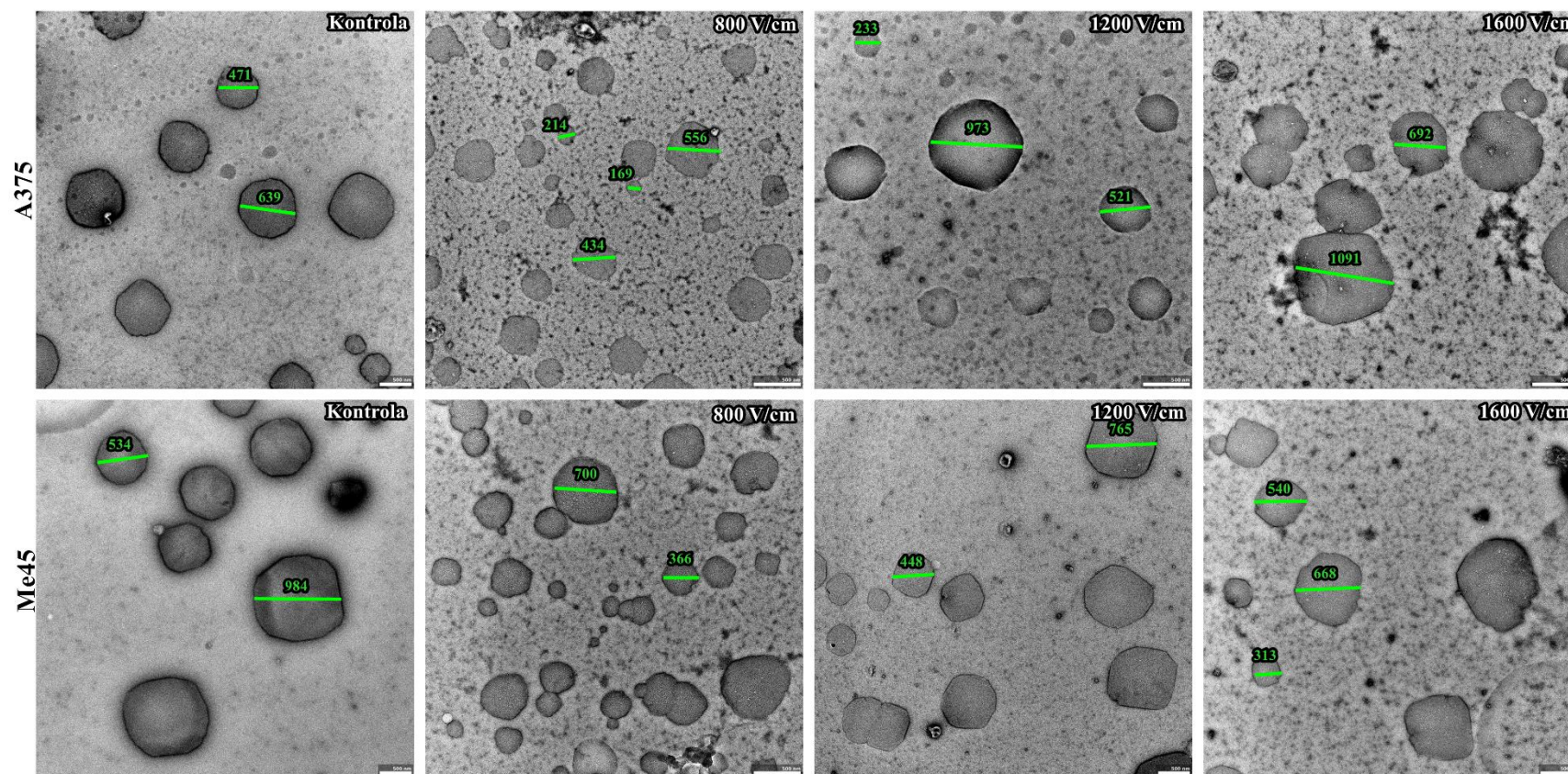
Podsumowując, we wszystkich liniach zaobserwowano wzrost stężenia markera CD63 w próbkach zawierających MVEs pochodzących od elektroporowanych komórek. Świadczyć to może o zwiększonym uwalnianiu mikropęcherzyków wskutek ekspozycji na zewnętrzne impulsy elektryczne i/lub zwiększoną ekspresję tego markera na powierzchni MVEs.

#### **5.4 OBRAZOWANIE MIKROPĘCHERZYKÓW PRZY UŻYCIU TRANSMISYJNEJ MIKROSKOPII ELEKTRONOWEJ (TEM)**

Transmisyjna mikroskopia elektronowa została wykorzystana do wizualizacji MVEs wyizolowanych z supernatantów komórek czerniaka linii A375 oraz Me45, po EP przy użyciu trzech różnych natężeń pola elektrycznego (800, 1200 i 1600 V/cm). MVEs wyizolowano, stosując metodę wirowania sekwencyjnego 24 godziny od chwili dostarczenia impulsów elektrycznych. Celem było potwierdzenie skuteczności wykorzystanego protokołu izolacji oraz wizualna ocena rozkładu wielkości MVEs.

Wykonane zdjęcia pokazują bardzo zróżnicowane populacje MVEs pod względem wielkości dla badanych linii komórkowych we wszystkich warunkach EP. Jak ukazano poniżej (**Rycina 12**), średnice tych mikropęcherzyków wahały się od 150 do 1100 nm. Tak szeroka rozpiętość wielkości tych struktur ukazuje jak wysoce heterogeniczne są ich populacje. Sugeruje również, iż EP nie wpływa selektywnie na wielkość uwalnianych przez komórki MVEs.





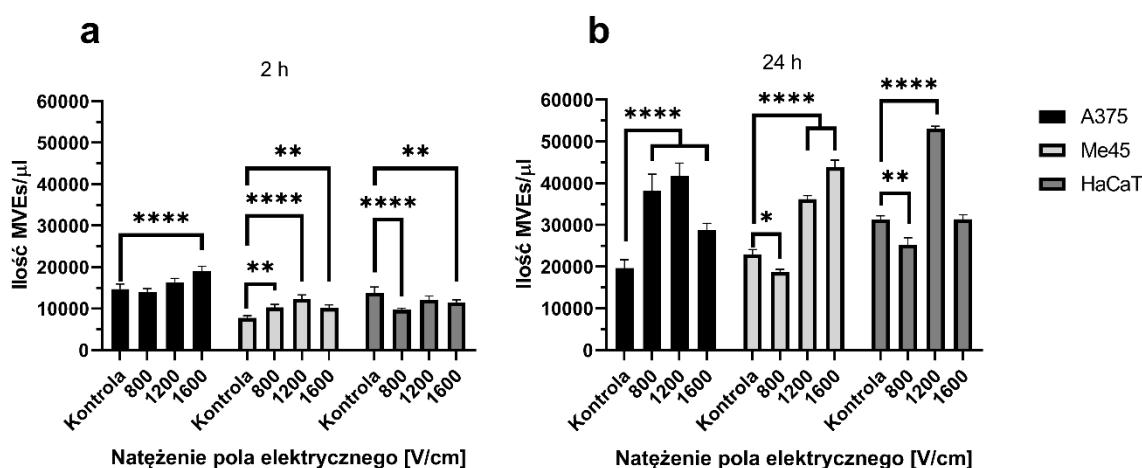
**Rycina 12** Obrazy z transmisyjnego mikroskopu elektronowego ukazujące wyizolowane MVEs pochodzące od linii A375 (górny rząd) i Me45 (dolny rząd) 24 godz. po wykonaniu EP. Widoczna na zdjęciach skala odpowiada 500 nm. Pomiary średnic (nm) poszczególnych MVEs wykonano w programie ImageJ (wersja 1.53C, <https://imagej.net/>).

Ukazane na zdjęciach wykonanych transmisyjnym mikroskopem elektronowym MVEs wykazują we wszystkich próbkach ogólnie nienaruszoną morfologię, co wskazuje, że wybrana metoda ich izolacji zachowała ich strukturę i integralność. Jest to kluczowa informacja w aspekcie dalszych zaprezentowanych analiz testów funkcjonalnych.

#### 5.4.1 Ocena ilościowa i jakościowa mikropęcherzyków

#### 5.4.2 Analiza ilościowa MVEs

Aby ocenić w jakim stopniu zastosowanie EP wpływa na uwalnianie przez komórki nowotworowe MVEs, wybarwione kalceiną mikropęcherzyki poddano analizie cytometrycznej. MVEs izolowano 2 i 24 godziny po wykonaniu elektroporacji, a następnie zawieszano w PBS i inkubowano z barwnikiem. Poniższe wykresy przedstawiają pomiar ilościowy MVEs w 1  $\mu\text{L}$  badanej próbki. (Rycina 13).



**Rycina 13** Ilość MVEs pozyskanych po 2 (a) i 24 godzinach (b) od elektroporacji różnymi parametrami. Istotność statystyczną w odniesieniu do komórek kontrolnych danej linii wyznaczono jednoczynnikową analizą wariancji (test ANOVA) i testem Dunetta, gdzie \* statystycznie istotne dla  $p \leq 0,005$ , \*\* dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\* dla  $p = 0,001$  i \*\*\*\* dla  $p \leq 0,001$ .

Po 2 godzinach od zastosowania EP ilość MVEs uwalnianych przez komórki czerniaka wzrosła w większości badanych parametrów. Linia A375 ukazała największą różnicę w ilości MVEs w stosunku do mikropęcherzyków izolowanych z komórek nietraktowanych w przypadku parametru 1600 V/cm. Liczba wyizolowanych mikropęcherzyków wynosiła kolejno:  $14732,25 \pm 1172,79$  (0 V/cm) i  $18991,55 \pm 1214,65$  (1600 V/cm), co przekłada się na jej 28,91% wzrost. W przypadku linii Me45 wyróżniającym się parametrem jest 1200 V/cm, gdzie ilość MVEs zwiększyła się aż o 57,54% ( $7781,95 \pm 481,39$  dla 0 V/cm i  $12260 \pm 698,80$  dla 1200 V/cm). Wzrost ilości MVEs istotny

statystycznie zaobserwowano również po zastosowaniu pola elektrycznego o natężeniu 800 V/cm ( $10269,25 \pm 736,97$ ) i 1600 V/cm ( $10198,60 \pm 698,80$ ).

Liczba MVEs wyizolowanych po 2 godzinach z elektroporowanych uprzednio komórek linii HaCaT była niższa, jak tych pochodzących z komórek niewystawionych na działanie impulsów elektrycznych, w przypadku parametru 800 V/cm spadek wynosił nawet 29,53% ( $13789,65 \pm 1445,12$  dla 0 V/cm oraz  $9717,05 \pm 349,07$  800 V/cm).

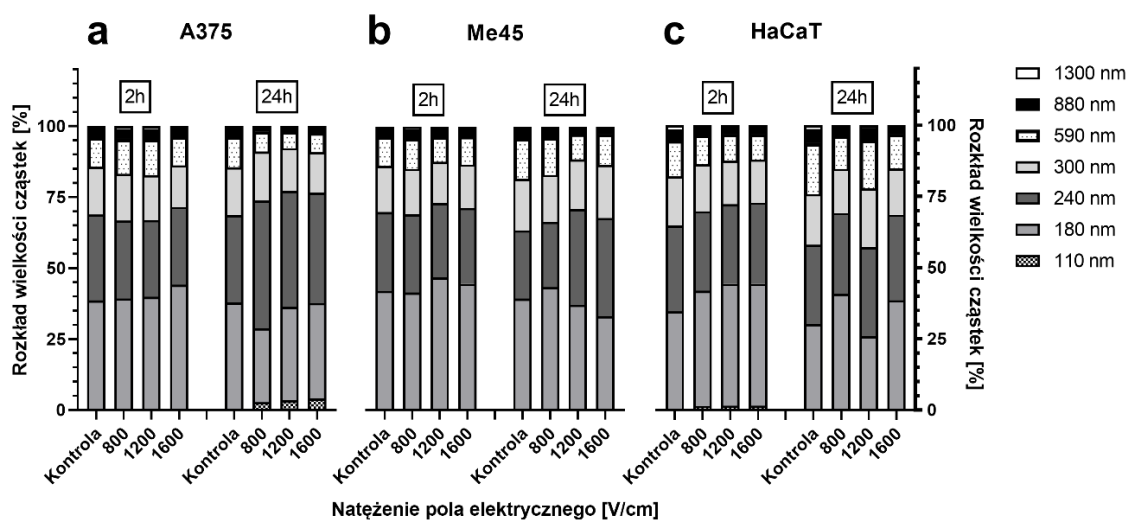
W dobę po elektroporacji komórek ilość wyizolowanych MVEs znacząco się zwiększyła w niemal każdym z badanych warunków EP, we wszystkich liniach komórkowych. Wyjątkiem był parametr 800 V/cm zastosowany u linii Me45 i HaCaT – w tym przypadku zaobserwowano niewielki spadek liczby MVEs w stosunku mikropęcherzyków pochodzących od komórek kontrolnych (Me45:  $22985,67 \pm 1144,65$  i  $18665,07 \pm 687,65$ ; HaCaT:  $31278,87 \pm 873,72$  i  $25214,40 \pm 1696,38$ ). Dla linii A375 oraz HaCaT parametrem ukazującym największą zmianę było 1200 V/cm. Po 24 godzinach od EP z komórek czerniaka i keratynocytów wyizolowano ok. 2-krotnie więcej MVEs niż z komórek nieelektroporowanych (linia A375:  $19679,2 \pm 2081$  i  $41811,40 \pm 3024$ ; linia HaCaT:  $31278,87 \pm 873,72$  i  $53085,53 \pm 573,94$ ). Ilość MVEs pozyskanych od komórek Me45 po zastosowaniu 1600 V/cm również zwiększyła się ok 2-krotnie ( $22985,67 \pm 1144,65$  i  $43806,73 \pm 1726,55$ ).

Porównując oba czasy inkubacji (2 i 24 godziny) po wykonaniu EP można zauważyć, że pod wpływem stresora, komórki na przestrzeni doby produkują generalnie znacznie więcej MVEs, jak komórki grup kontrolnych. Średnio wzrost ten jest niemalże 2,5-krotny w stosunku do krótszego czasu inkubacji.

### **5.4.3 Analiza rozkładu wielkości MVEs**

W celu dokładnego określenia wielkość wyizolowanych MVEs w czasie 2 i 24 godzin od EP, wykonano cytometrię przepływową z użyciem zestawu kulek kalibracyjnych ApogeeMix. Pozwoliło to przypisać MVEs do poszczególnych podgrup, bazując na ich średnicy oraz przeanalizować ich rozkład wielkości (**Rycina 14**).





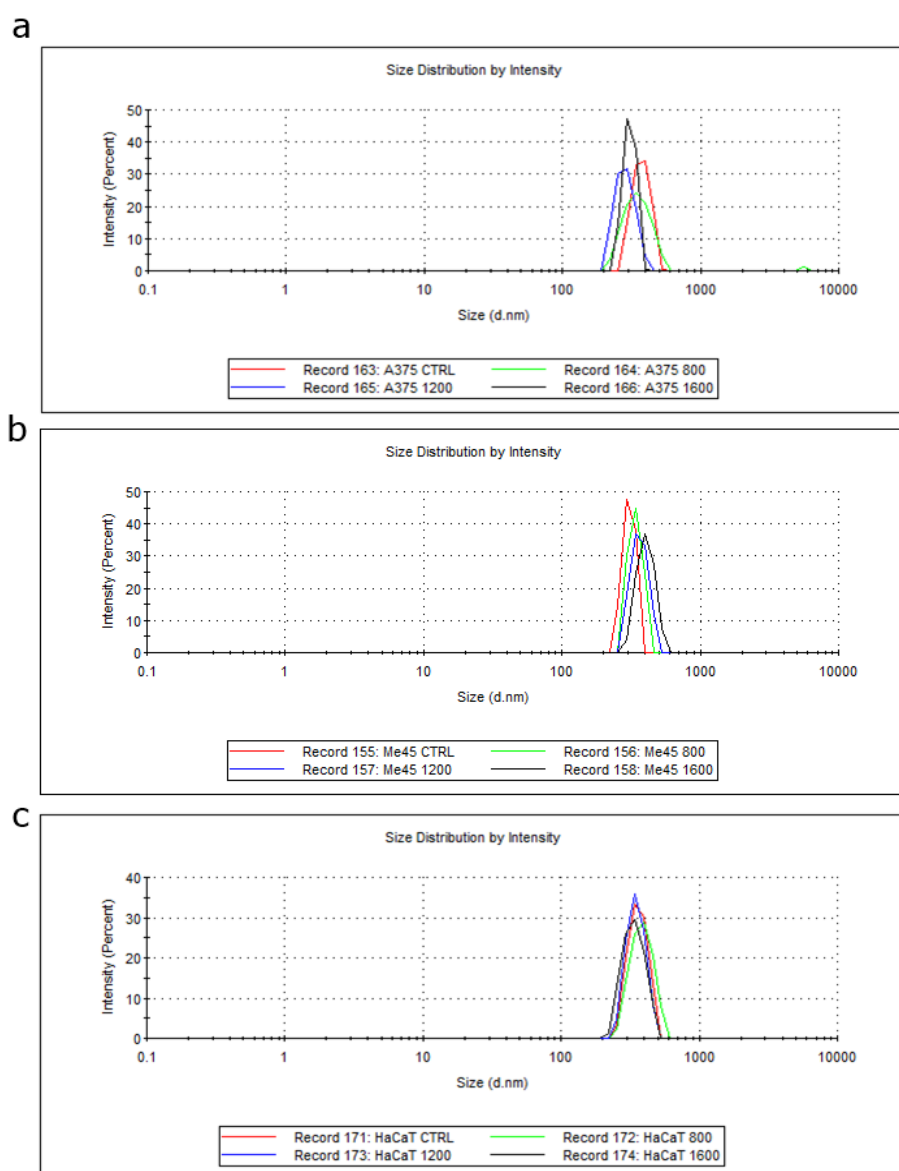
**Rycina 14** Rozkład wielkości MVEs pochodzących od komórek linii A375 (a), Me45 (b) oraz HaCaT (c) w zależności od zastosowanego parametru EP. MVEs wyizolowano po 2 i 24 godzinach od zastosowania impulsów elektrycznych.

Przeprowadzone pomiary nie ukazały znaczących zmian w rozkładzie wielkości MVEs podczas porównywania parametrów EP w obrębie jednej linii, jak i pomiędzy badanymi liniami komórkowymi. Nie wykazano również wyraźniej tendencji do tworzenia MVEs o określonej średnicy. Nie zaobserwowano także istotnych zmian po zestawieniu danych uzyskanych po 2 i 24 godzinach od EP. Przeprowadzona analiza cytometryczna wykazała, że największą populację tworzyły małe mikropęcherzyki (180-300 nm), stanowiąc średnio  $83,36\% \pm 3,90$  wszystkich uzyskanych MVEs, biorąc pod uwagę trzy linie komórkowe.

Znikoma ilość mikropęcherzyków pozakomórkowych o wielkości  $\leq 110$  nm potwierdza brak obecności egzosomów w analizowanych próbkach a tym samym sukces zastosowanego protokołu izolacji samych MVEs.

#### 5.4.4 Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)

Wielkość MVEs uzyskanych po izolacji z supernatantu znad komórek analizowano również metodą DLS (**Rycina 15**). Pomiary średnicy mikropęcherzyków, izolowanych 2 godziny po przeprowadzeniu EP badanych komórek w dużej mierze pokrywały się z danymi uzyskanymi poprzez cytometrię przepływową. W obu przypadkach nie zaobserwowano większych odstępstw w wielkości MVEs w stosunku do grup kontrolnych. Wyniki świadczyły też o heterogeniczności roztworów, ze względu na zróżnicowanie rozmiary tych błoniastych struktur.



**Rycina 15** Analiza wielkości MVEs techniką dynamicznego rozpraszania światła (DLS) pochodzących z komórek linii A375 (a), Me45(b) i HaCaT (c). Wykresy zostały wygenerowane w dedykowanym programie Zetasizer software (wersja 3.30). Wielkość „Intensity (Percent)” ukazuje jak różne rozmiary badanych cząstek przyczyniają się do ogólnej intensywności rozproszenia światła, co pozwala na analizę ich rozkładu wielkości w badanej próbce.

Na podstawie otrzymanych danych z urządzenia Zetasizer ustalono, iż średnica MVEs wahała się pomiędzy 200 a 600 nm. Najliczniejszą grupę stanowiły mikropecherzyki o wielkości między 300 a 400 nm. Ponownie, nie zanotowano obecności cząsteczek o wielkości zbliżonej do egzosomów.

Warto podkreślić, że pomiary uzyskane metodą DLS należy interpretować ostrożnie, szczególnie w przypadku pomiarów roztworów zawierających bardzo zróżnicowanej wielkości cząsteczki. W niniejszej pracy nie zaprezentowano wyników pomiarów wielkości MVEs izolowanych 24 godziny po EP, ponieważ odczytany przez urządzenie indeks polidyspersyjności (ang. Polydispersity index – PI) próbek był zbyt wysoki. Obecne w zawiesinie MVEs były zbyt zróżnicowane pod względem morfologicznym, aby otrzymane pomiary można było uznać za wiarygodne. Same mikropęcherzyki mogły tworzyć agregaty, czego dowodem jest widoczny na wykresie niewielki pik przy parametrze 800 V/cm u linii A375, oznaczający obecność cząsteczek o wielkości ok. 5500 nm (**Rycina 10**). Ponadto, urządzenie Zetasizer może wykonać pomiar MVEs uszkodzonych czy nawet ich fragmentów, podczas gdy dane pochodzące z cytometrii przepływowej opierają się na zmianie acetoksymetylokalceiny w kalceinę w obecności enzymów znajdujących się w cytozolu. Oznacza to, że by MVEs mogły zostać przeanalizowane przez cytometr, ich struktura powinna pozostać kulista i nienaruszona, aby wewnątrzpecherzykowe esterazy mogły przekształcić zastosowany odczynnik w jego fluorescencyjną formę. To może częściowo wyjaśniać odstępstwa w pomiarach pomiędzy metodą DLS a analizą cytometryczną.

#### **5.4.5 Testy żywotności i proliferacji - wpływ MVEs na komórki**

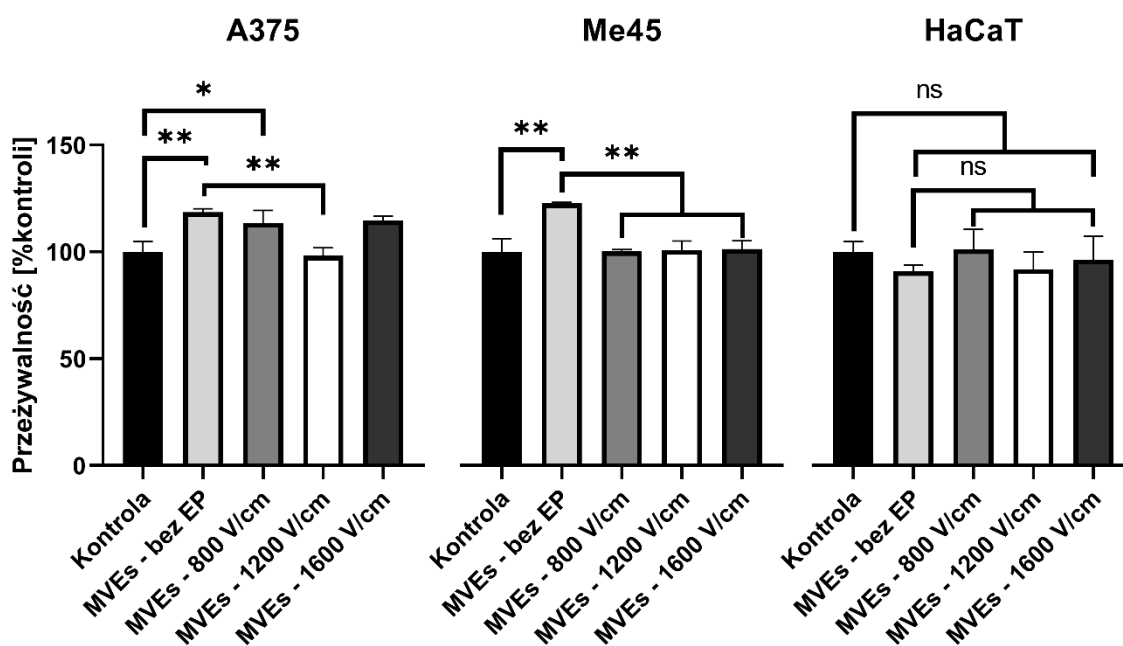
Celem określenia jak otrzymane MVEs wpływają na wzrost i rozwój innych komórek tej samej linii, wykonano test PrestoBlue™ przy zastosowaniu 72-godzinnego czasu inkubacji.

Supernatant niczym nietraktowanych komórek nasadzonych na płytce 96-dołkową został wzbogacony o mikropęcherzyki wyizolowane z medium znad komórek nieelektroporowanych lub elektroporowanych na płycie 6-dołkowej elektrodą kontaktową. Kontrolę stanowiły komórki, których supernatant nie zawierał dodatku MVEs. Eksperyment został ograniczony do traktowania MVEs komórek tej samej linii, z której one pochodziły.

W przypadku linii nowotworowych A375 oraz Me45 nastąpił wzrost proliferacji komórek po dodaniu do medium MVEs kolejno o 18,59 i 22,65% w stosunku do komórek

grup kontrolnych. W przypadku linii prawidłowych keratynocytów HaCaT zanotowano niewielki spadek w wysokości 9,01% (**Rycina 16**).

Porównując przeżywalność komórek czerniaka, które były poddane działaniu MVEs z komórek elektroporowanych lub nieelektroporowanych, można zauważyć, że zastosowanie impulsów elektrycznych spowodowało uwalnianie MVEs, które działały hamująco na proliferację. Oceniając linię A375, zanotowano spadek przeżywalności we wszystkich badanych próbach, ale istotnie statystyczna jest zmiana po inkubacji komórek z MVEs pochodzącymi od komórek elektroporowanych parametrem 1200 V/cm, która wynosiła 20,42%. Z kolei u linii Me45 napięcie zastosowanego pola elektrycznego nie miało większego znaczenia – MVEs wyizolowane z komórek elektroporowanych parametrami 800, 1200 oraz 1600 V/cm spowodowały podobne zmniejszenie przeżywalności komórek kolejno o 22,29; 21,78 i 21,36%.



**Rycina 16** Przeżywalność komórek linii A375, Me45 oraz HaCaT wyznaczona testem PrestoBlue po 72 godzinach od dodania MVEs do supernatantu badanych komórek. Istotność statystyczną w odniesieniu do komórek kontrolnych (Kontrola) i komórek traktowanych MVEs z nieelektroporowanych komórek (MVEs – bez EP) wyznaczono dwuczynnikową analizą wariancji (test ANOVA) i testem Tukeya, \* statystycznie istotne dla  $p \leq 0,005$ , \*\* dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\* dla  $p = 0,001$  i \*\*\*\* dla  $p \leq 0,001$ .

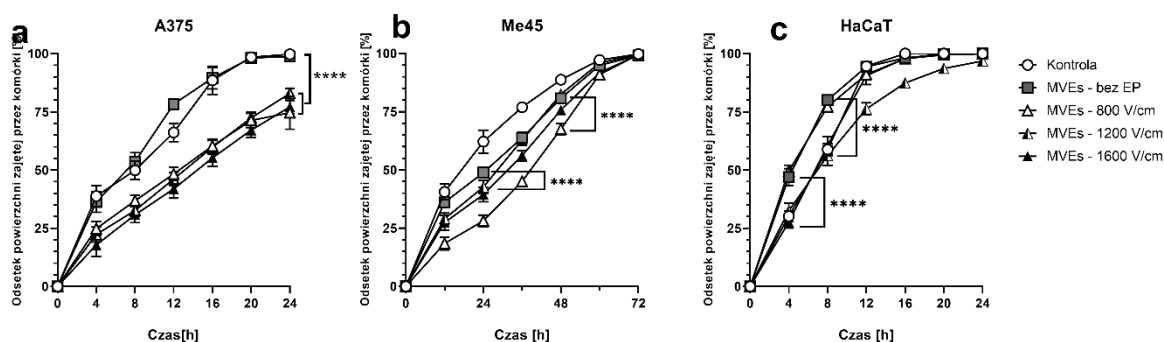
Podsumowując, MVEs wyizolowane z komórek czerniaka poddanych elektroporacji wykazują efekt przeciwny, hamujący proliferację, jak mikropęcherzyki pochodzące z komórek nietraktowanych impulsami elektrycznymi. Podobnej tendencji nie zauważono

u keratynocytów, a otrzymane wyniki i różnice pomiędzy próbami, były nieistotne statystycznie.

#### 5.4.6 Test zarastania ran do oceny migracji i proliferacji komórek

Aby określić wpływ wyizolowanych MVEs na właściwości biologiczne, takie jak migracja i proliferacja komórek, przeprowadzono test zarastania rany (ang. *Wound-healing assay*). Analizowane komórki nowotworowe i keratynocyty zostały poddane działaniu uprzednio wyizolowanych MVEs z supernatantu znad komórek elektroporowanych jak i niepoddanych działaniu EP. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane mikropęcherzykami. Zdjęcia migrujących komórek były wykonywane do momentu zarośnięcia przerwy między komórkami grupy kontrolnej przyklejonymi do dna dołka płytki 24-dołkowej (**Ryciny 13, 14 i 15**).

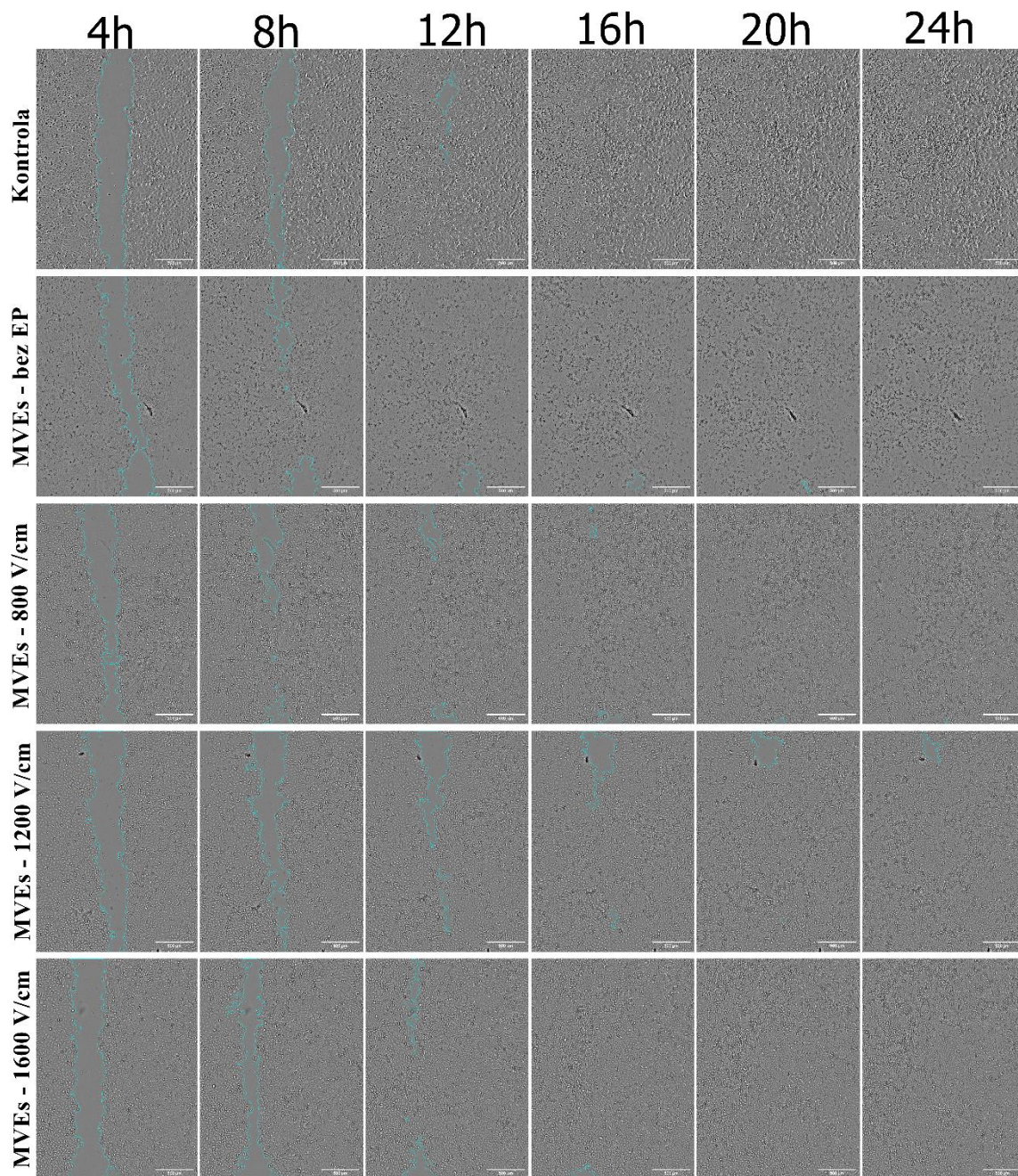
Analiza wykonanych mikroskopem zdjęć wykazała, że MVEs pochodzące z komórek elektroporowanych powodują osłabienie zdolności migracyjnych i proliferacyjnych komórek czerniaka obu linii (**Rycina 17**). W przypadku linii komórkowej A375, różnice istotne statystycznie zanotowano między komórkami traktowanymi MVEs pochodzącymi z komórek elektroporowanych a tymi z komórek nieelektroporowanych już w 8 godzinie obserwacji. w przypadku linii Me45 podobna sytuacja była zauważalna dla parametrów 800 i 1200 V/cm również przez niemal cały czas trwania pomiarów. Dla pozostałych parametrów widocznych na wykresach różnice nie były statystycznie istotne.



**Rycina 17** Analiza ilościowa zdolności komórek linii A375, Me45 i HaCaT do migracji i proliferacji. Komórki inkubowano z wyizolowanymi MVEs i analizowano przy pomocy programu ImageJ (wersja 1.53C, <https://imagej.net/>). Do celów statystycznych wykorzystano dwukierunkową analizę wariancji (ANOVA) z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego. \* statystycznie istotne dla  $p \leq 0,005$ , \*\* dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\* dla  $p = 0,001$  i \*\*\*\* dla  $p \leq 0,001$ .

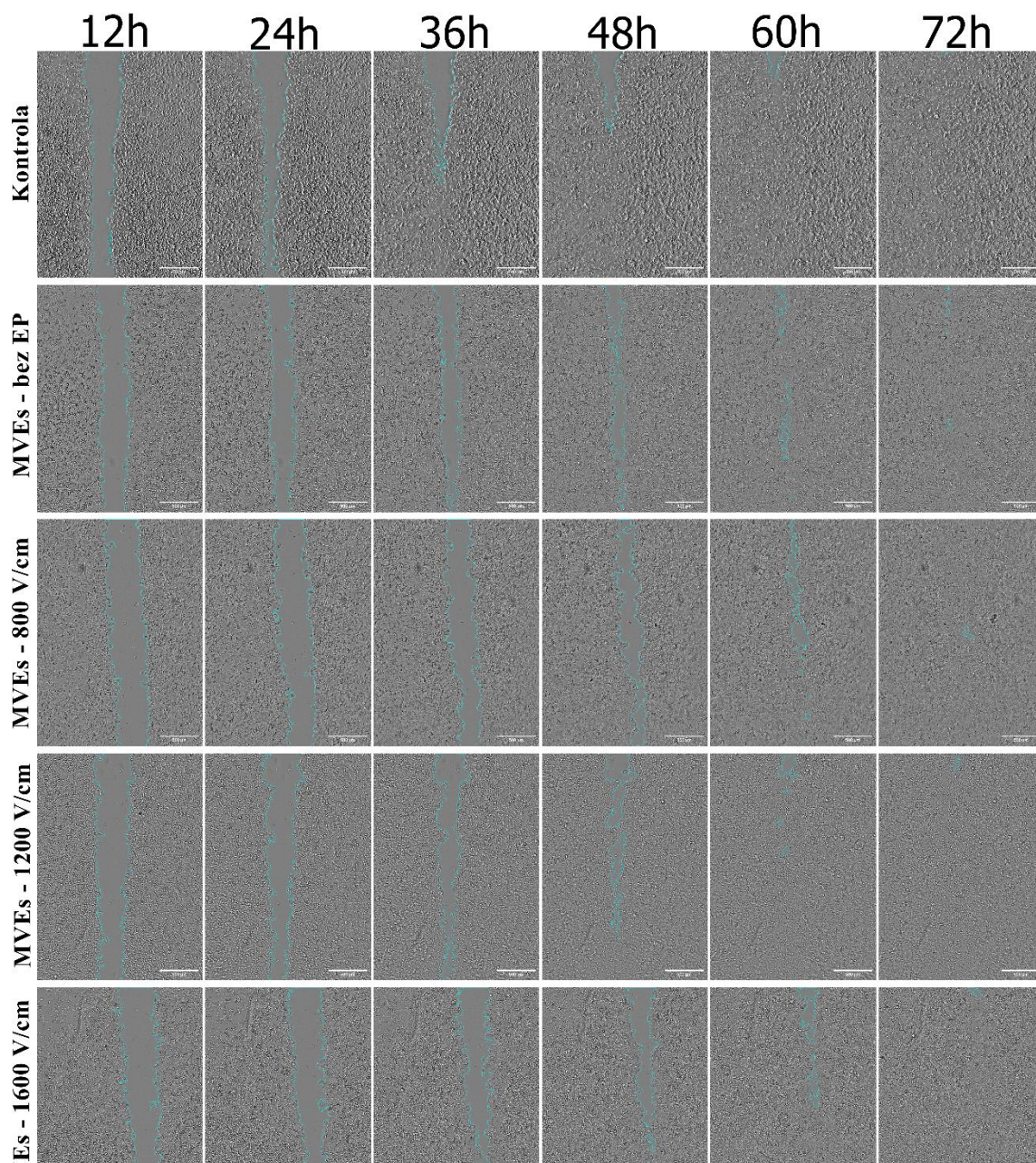






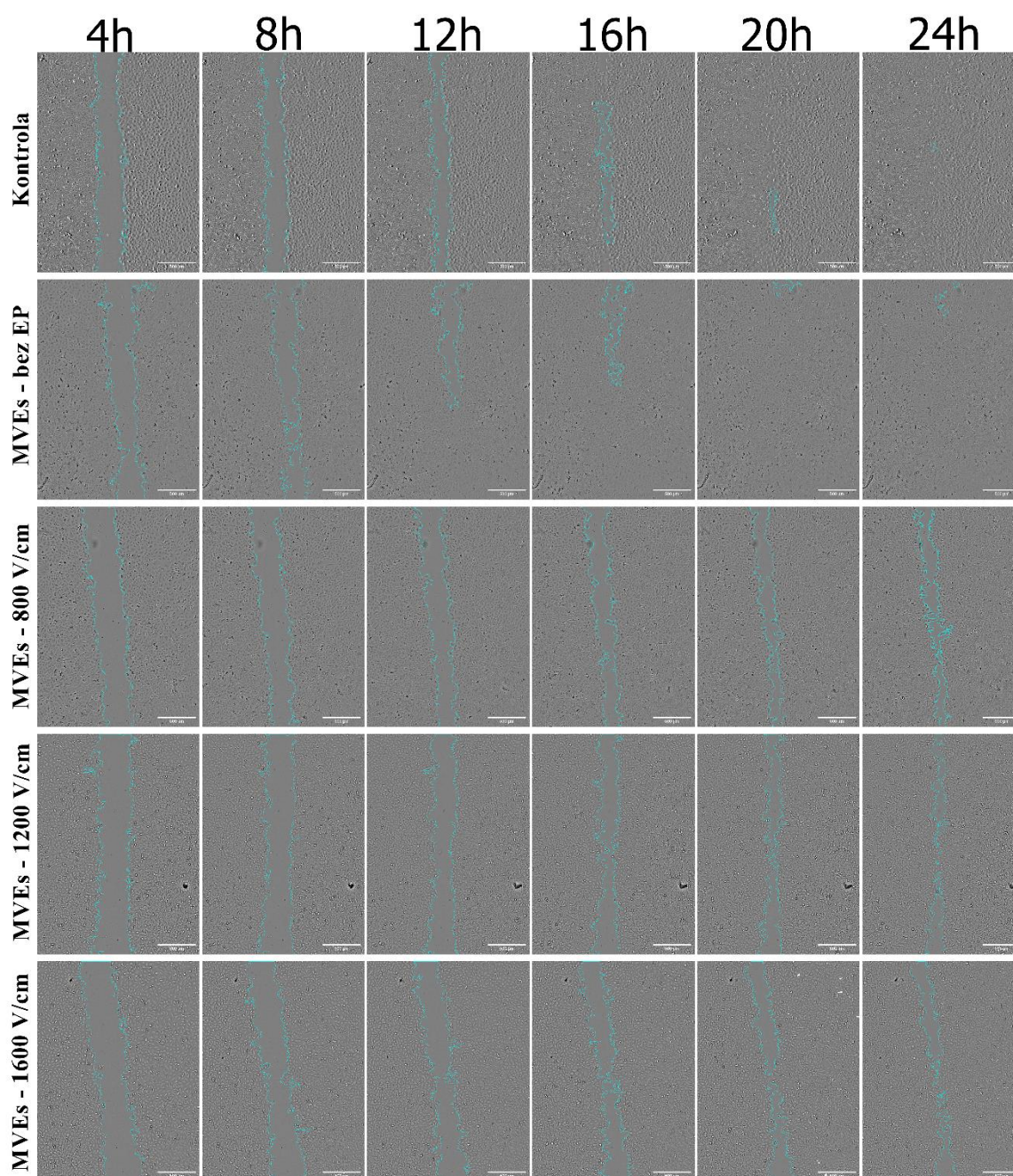
**Rycina 18** Zdjęcia wykonane mikroskopem odwróconym (Leica) obrazujące migrację komórek linii A375 podczas 24-godzinnego testu zarastania rany. Analiza została wykonana programem ImageJ (wersja 1.52) z dedykowanym rozszerzeniem „Wound healing size tool”.





**Rycina 19** Zdjęcia wykonane mikroskopem odwróconym (Leica) obrazujące migrację komórek linii Me45 podczas 72 -godzinnego testu zarastania rany. Analiza została wykonana programem ImageJ (wersja 1.52) z dedykowanym rozszerzeniem „Wound healing size tool”.





**Rycina 20** Zdjęcia wykonane mikroskopem odwróconym (Leica) obrazujące migrację komórek linii HaCaT podczas 24-godzinnego testu zarastania rany. Analiza została wykonana programem ImageJ (wersja 1.52) z dedykowanym rozszerzeniem „Wound healing size tool”.

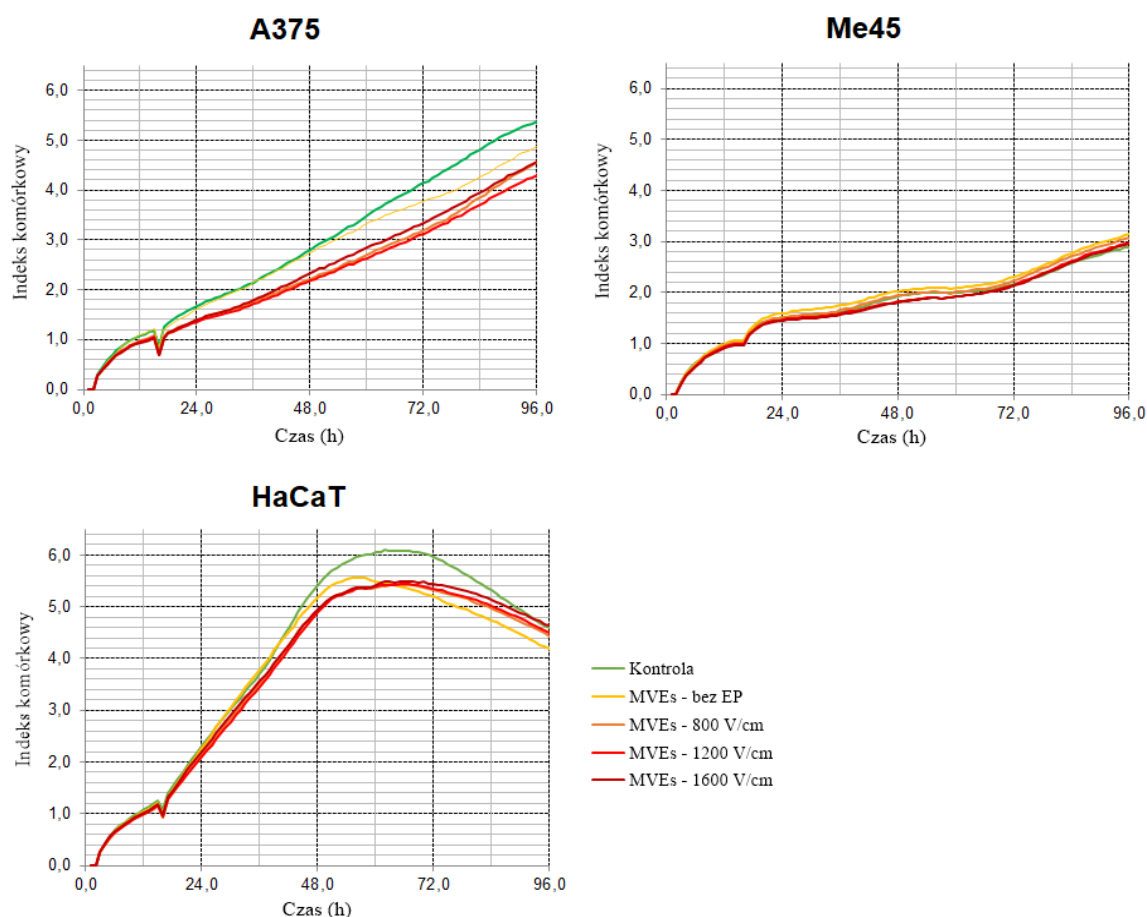
W przypadku keratynocytów nie zanotowano wyraźnego spowolnienia wzrostu czy ruchu komórek, tak jak to miało miejsce u komórek linii nowotworowych. Jedyne wpływy MVEs były zauważalne na początku eksperymentu, jednak w kolejnych godzinach wzrost komórek wszystkich badanych wariantów był porównywalny.

#### **5.4.7 Analiza impedancji przy użyciu systemu RTCA-iCELLigence™**

Na poniższych wykresach przedstawiono wyniki pomiarów impedancji komórkowej linii A375, Me45 oraz HaCaT. Celem badania było określenie wpływu MVEs na badane komórki w kontekście migracji, zdolności proliferacyjnych i adhezyjnych oraz oddziaływań komórka-komórka oraz komórka-podłoże. System RTCA-iCELLigence wykrywa wahania impedancji pochodzącą z reakcji międzykomórkowych na elektrodach jako zmianę indeksu komórkowego (ang. *cell index*; CI). Im wyższy współczynnik proliferacji i adhezji komórek, tym większy jest wzrost impedancji.

W około 17 godzinie eksperymentu, po całkowitym przyłgnięciu komórek do podłoża z elektrodami, do supernatantów dodano wyizolowane uprzednio MVEs, co jest widoczne na wykresach w postaci charakterystycznego uskoku (**Rycina 21**). Uzyskane dane dotyczące linii A375 oraz HaCaT potwierdzają, że obecność poelektroporacyjnych MVEs w supernatancie komórek powoduje spadek impedancji komórkowej w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednakże, dynamika tego spowolnienia jest odmienna u tych linii. W przypadku komórek czerniaka do spadku CI dochodzi tuż po dodaniu mikropęcherzyków i trend ten utrzymuje się przez cały czas trwania eksperymentu. Z kolei na keratynocyty MVEs działają z opóźnieniem. Różnica w impedancji widoczna jest dopiero w ok. 30 godzinie i najwyraźniejsza jest tuż przed osiągnięciem przez komórki maksymalnej konfluencji. Co ciekawe, w obu przypadkach obecność MVEs pozyskanych od komórek nieelektroporowanych również działa hamująco na procesy biologiczne komórek, choć w mniejszym stopniu. Komórki potraktowane takimi mikropęcherzykami wykazują również szybsze osiągnięcie maksimum indeksu komórkowego i jego bardziej gwałtowny, stromy spadek, co pośrednio oznacza zwiększoną zdolność komórek do odrywania się od innych komórek i podłoża na końcowych etapach eksperymentu.

Wyniki otrzymane dla linii Me45 ukazują pewną niewrażliwość komórek na wpływ MVEs. Podobny poziom indeksu komórkowego we wszystkich badanych wariantach jest oznaką braku wyraźnych zmian w adhezji i migracji komórek.

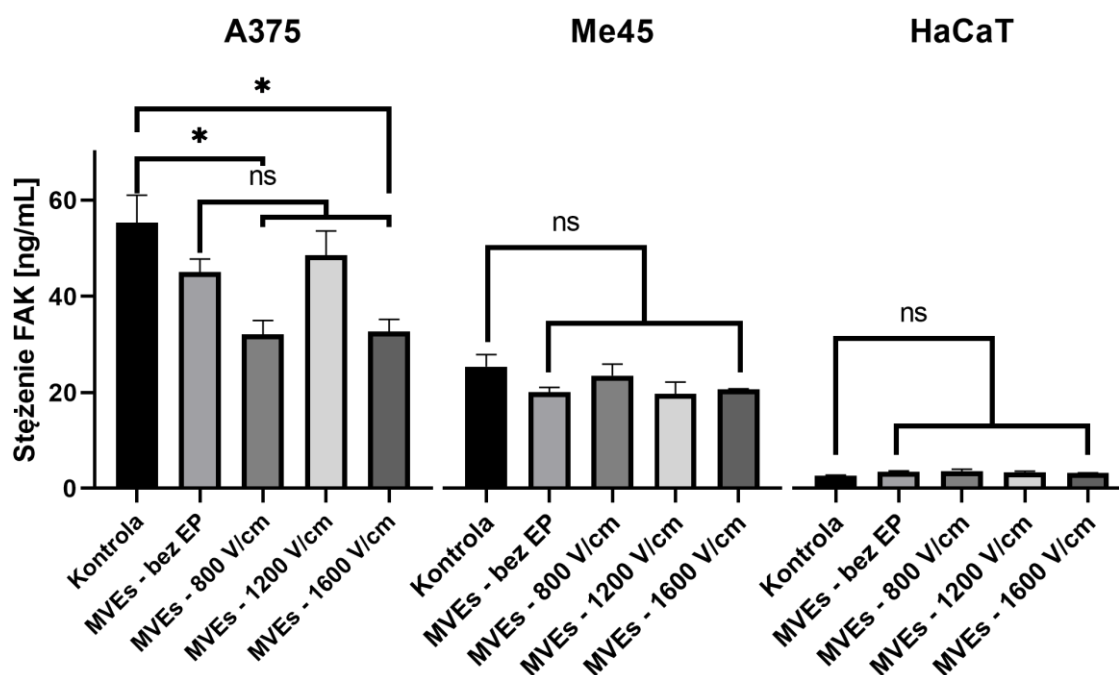


**Rycina 21** Analiza zmian impedancji komórkowej linii A375, Me45 oraz HaCaT. Wykresy zostały wygenerowane w dedykowanym programie iCELLigence.

#### 5.4.8 Oznaczanie całkowitej kinazy adhezji ogniskowej (FAK) za pomocą testu ELISA

Aby określić, jak zmienia się stężenie całkowitej kinazy ogniskowo-adhezyjnej (ang. *focal adhesion kinase*; FAK) w komórkach, które były inkubowane przez 48 godz. z wyizolowanymi MVEs, wykonano test immunoenzymatyczny typu ELISA. Enzym ten jest kluczowym uczestnikiem szlaków sygnałowych regulujących adhezję i wzrost komórek. Jego bazowy poziom pośrednio obrazuje zdolności komórki do migracji i inwazji jak również do przenikania przez śródbłonek naczyń.

Na podstawie wykresów obrazujących stężenie FAK w lizatach komórek kontrolnych linii A375, Me45 oraz HaCaT można wywnioskować, że linią o największej zdolności do aktywnego poruszania się jest linia czerniaka z guza pierwotnego (**Rycina 22**). Stężenie tej kinazy w komórkach A375 ( $55,29 \pm 5,76$  ng/mL) jest ponad 2-krotnie wyższe jak u linii Me45 ( $25,35 \pm 2,50$  ng/mL). Keratynocyty cechuje najmniejsza jej zawartość, czyli  $2,63 \pm 0,16$  ng/mL, Bliskie granicy oznaczalności ( $1,6$  ng/mL) w tym teście immunoenzymatycznym.



**Rycina 22** Analiza ilościowa kinazy ogniskowej (FAK) w lizatach komórek poddanych działaniu MVEs pochodzących z komórek nieelektroporowanych (MVEs - bez EP) oraz z komórek elektroporowanych różnymi parametrami. Istotność statystyczną wyznaczono dwuczynnikową analizą wariancji (test ANOVA) i testem Tukeya, \* statystycznie istotne dla  $p \leq 0,005$ .

Oceniając wpływ MVEs pochodzących z elektroporowanych i nieelektroporowanych komórek, można zauważyć, że oba rodzaje tych mikropęcherzyków powodują obniżenie poziomu FAK. W przypadku linii A375, różnica pomiędzy nimi nie jest istotna statystycznie, biorąc pod uwagę wszystkie parametry EP. Widoczny jest jednakże spadek stężenia FAK przy wartościach 800 V/cm oraz 1600 V/cm. Poziom kinazy u komórek traktowanych MVEs izolowanych z supernatantu komórek niepoddanych działaniu pola elektrycznego i MVEs pochodzących z komórek traktowanych parametrem 1200 V/cm jest zbliżony.

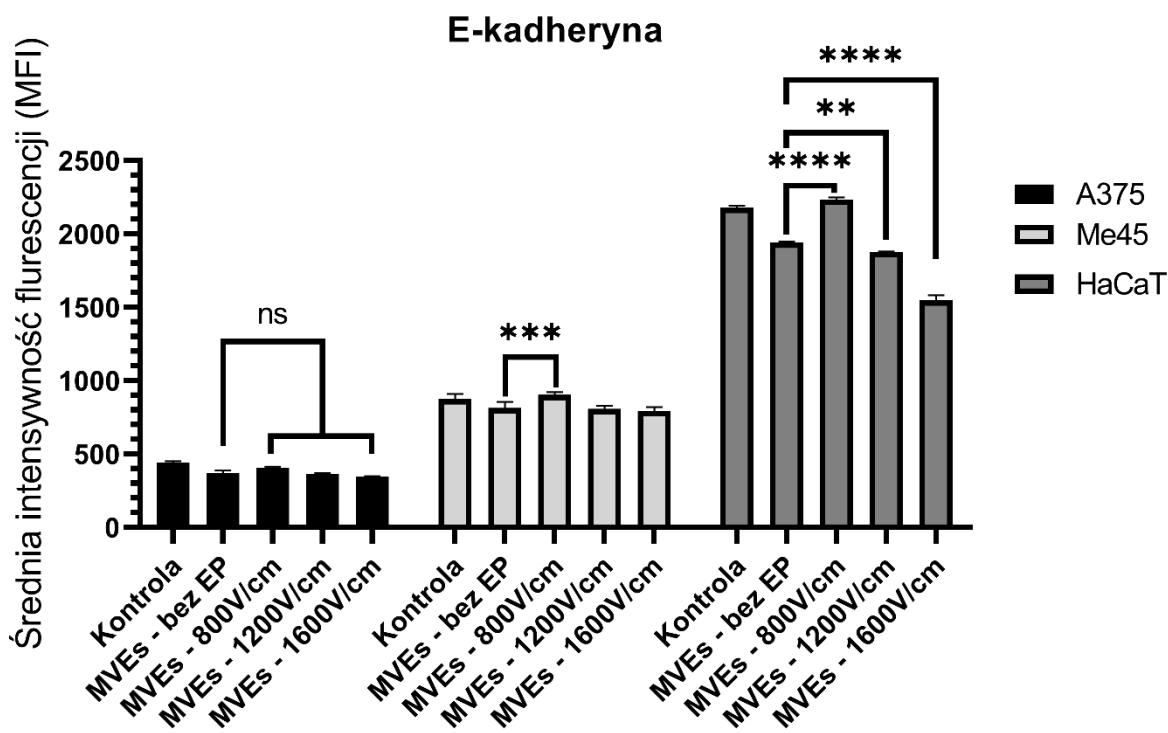
U komórek linii Me45 wykonanie EP przed izolacją MVEs nie miało większego znaczenia – wpływ pęcherzyków na FAK we wszystkich badanych wariantach był podobny,



stężenie enzymu wahało się między 19,69 a 23,46 ng/mL. Podobna zależność widoczna jest również u linii HaCaT, gdzie różnice pomiędzy wynikami poszczególnych grup były niezauważalne i statystycznie nieistotne.

#### 5.4.9 Oznaczanie poziomów E-kadheryny i N-kadheryny za pomocą cytometrii przepływowej

Komórki linii A375, Me45 oraz HaCaT poddano analizie cytometrycznej pod kątem obecności E- i N-kadheryny. Są to białka adhezyjne uczestniczące w oddziaływaniach międzykomórkowych. Komórki inkubowano z wyizolowanymi MVEs przez 48 godz., a następnie poddano analizie. Na kolejnych rycinach przedstawiono wykresy obrazujące zbiorczo ekspresję badanych markerów powierzchniowych (**Rycina 23 i Rycina 24**Rycina 23).



**Rycina 23** Analiza ilościowa E-kadheryny w komórkach linii A375, Me45 oraz HaCaT inkubowanych z wyizolowanymi MVEs pochodzącymi z komórek nieelektroporowanych (MVEs - bez EP) oraz elektroporowanych różnymi natężeniami pola elektrycznego. Istotność statystyczną wyznaczono dwuczynnikową analizą wariacji (test ANOVA) i testem Tukeya, \* statystycznie istotne dla  $p \leq 0,005$ , \*\* dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\* dla  $p = 0,001$  i \*\*\*\* dla  $p \leq 0,001$ .

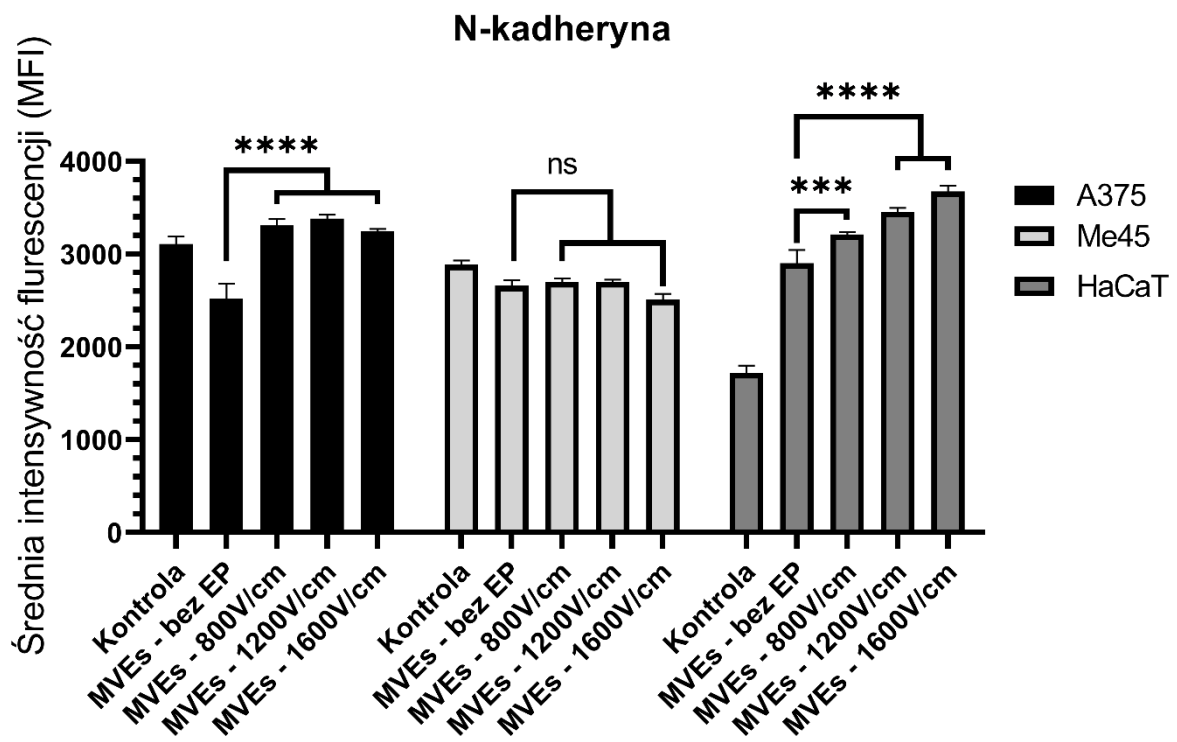
W przypadku E-kadheryny różnice w jej ekspresji widoczne są przede wszystkim u linii HaCaT. W porównaniu do komórek kontrolnych ( $2178 \pm 13,86$  MFI), odnotowaliśmy spadek średniej intensywności fluorescencji (MFI) pochodzącej od wyznakowanych przeciwciałem anti-E-kadheryna komórek, które były poddane działaniu MVEs od komórek nieelektroporowanych oraz elektroporowanych parametrami 1200 i 1600 V/cm (kolejno  $1940,67 \pm 13,86$ ;  $1876,67 \pm 4,16$ ;  $1547,67 \pm 35,35$  MFI). Elektroporacja komórek parametrem 800 V/cm spowodowała, że wyizolowane z nich MVEs spowodowały zwiększoną ekspresję E-kadheryny na powierzchni traktowanych nimi komórek ( $2235 \pm 13,11$  MFI), porównywalną do komórek kontrolnych.

U komórek czerniaka jedyną zmianę istotną statystycznie w ekspresji E-kadheryny możemy zaobserwować u linii Me45 przy parametrze 800 V/cm w porównaniu do komórek traktowanych MVEs z komórek nieelektroporowanych ( $813,67 \pm 40,87$ ;  $903 \pm 18,36$  MFI). Różnice w ekspresji E-kadheryny w obrębie linii A375 były nieistotne statystycznie.

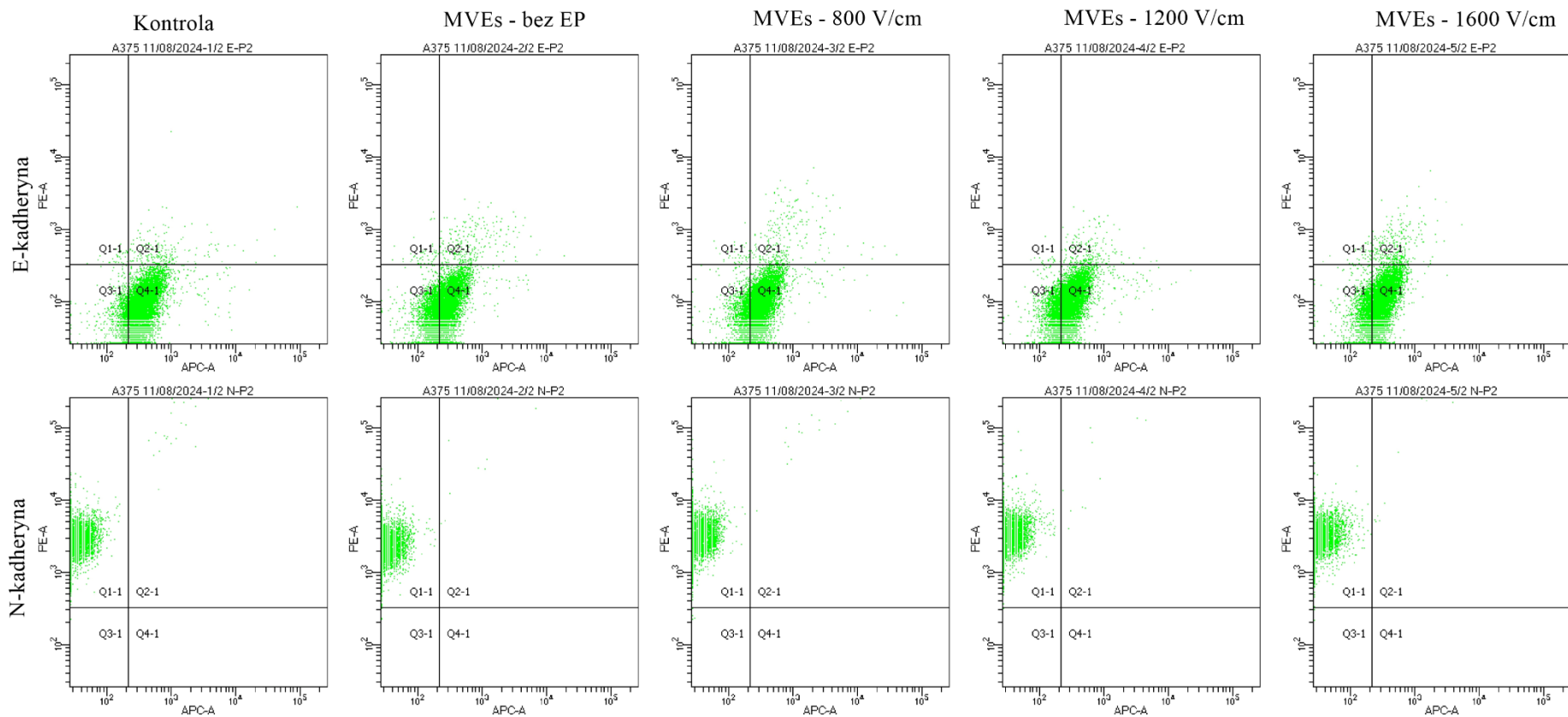
W przypadku N-kadheryny, u linii A375 zanotowano wzrost jej ekspresji, szczególnie w porównaniu komórek inkubowanych z MVEs pochodzącymi z komórek nieelektroporowanych ( $2519 \pm 161,28$  MFI) do tych z komórek elektroporowanych każdym z badanych natężeń pola elektrycznego ( $3309 \pm 69,35$ ;  $3381,33 \pm 42,1$ ;  $3249,67 \pm 22,37$  MFI). Odwrotna sytuacja miała miejsce u linii Me45. W jej przypadku nie zaobserwowano żadnych zmian, które byłyby istotne statystycznie.

Największe wahania w ekspresji N-kadheryny, podobnie jak i E-kadheryny, widoczne są u linii HaCaT. Obecność MVEs spowodowała gwałtowny jej wzrost, co stanowi duży kontrast w stosunku do innych badanych linii komórkowych. W porównaniu do komórek kontrolnych, sygnał pochodzący od wyznakowanych przeciwciał anti-N-kadherynie wzrósł o 68,82% u komórek rosnących w obecności MVEs pochodzących z komórek nieelektroporowanych. Zastosowanie elektroporacji spotęgowało ekspresję tego markera jeszcze o 11,61% (800 V/cm), 19,03 (1200 V/cm) i 26,60% (1600 V/cm). Zestawiając ze sobą wyniki dla linii HaCaT, można zauważyć pewną zależność – spadek poziomu E-kadheryny wiąże się ze wzrostem ekspresji N-kadheryny. Ponadto, im wyższy zastosowany parametr elektroporacji tym to powiązanie było bardziej wyraźne.

Podsumowując, wpływ MVEs od nieelektroporowanych i elektroporowanych komórek na ekspresję kadheryn był odmienny w przypadku każdej linii.

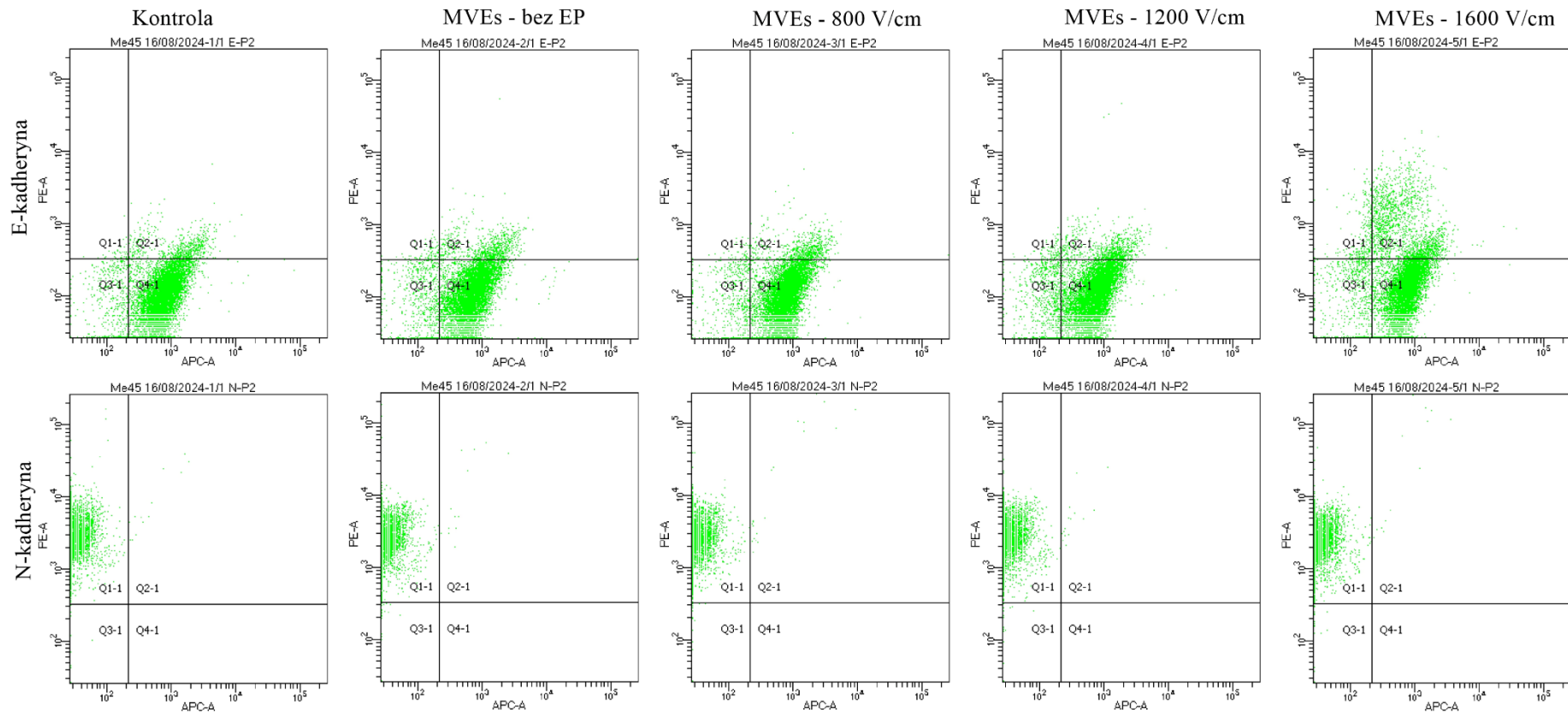


**Rycina 24** Analiza ilościowa E-kadheryny w komórkach linii A375, Me45 oraz HaCaT inkubowanych z wyizolowanymi MVEs pochodzącymi z komórek nieelektroporowanych (MVEs - bez EP) oraz elektroporowanych różnymi natężeniami pola elektrycznego. Istotność statystyczną wyznaczono dwuczynnikową analizą wariancji (test ANOVA) i testem Tukeya, \* statystycznie istotne dla  $p \leq 0,005$ , \*\* dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\* dla  $p = 0,001$  i \*\*\*\* dla  $p \leq 0,001$ .

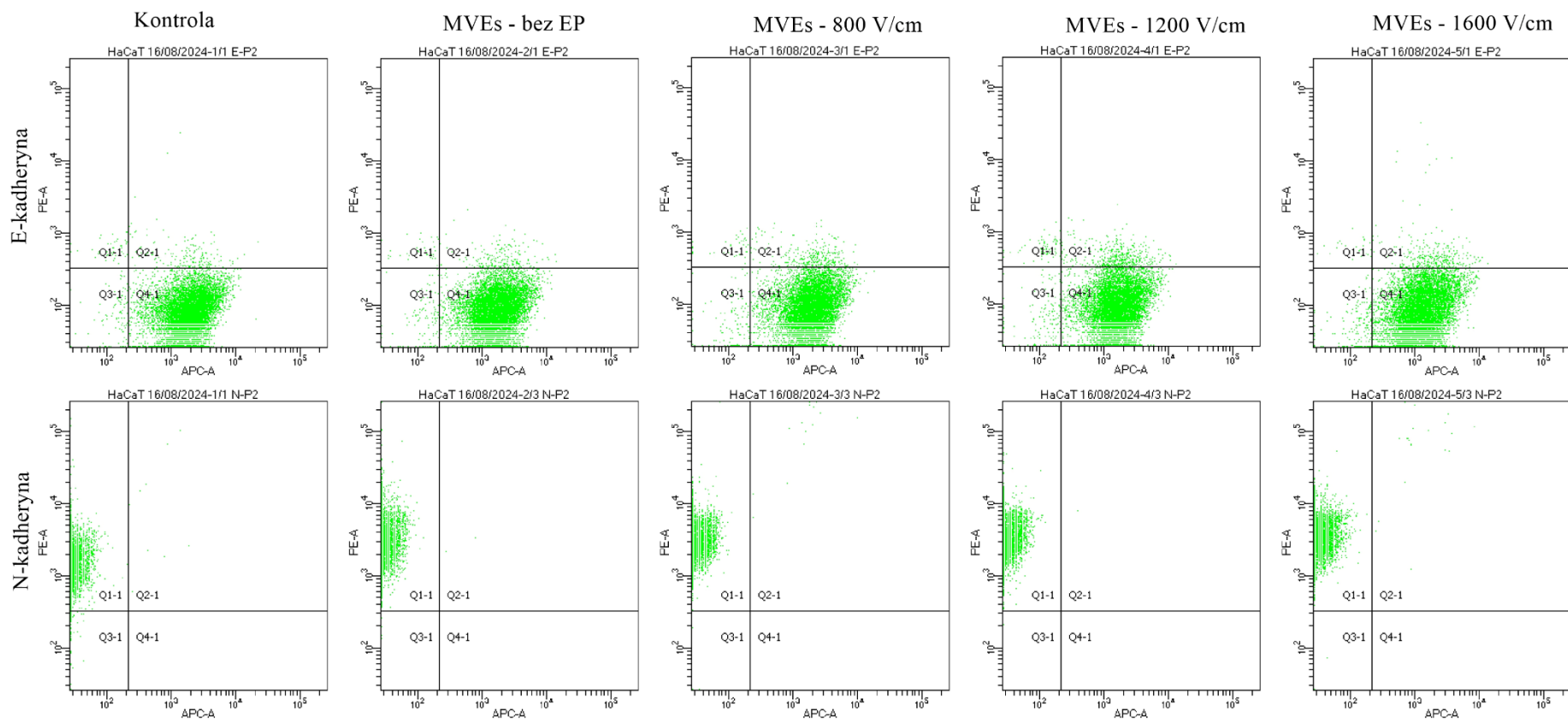


**Rycina 25** Wykresy typu dot-plot przedstawiające ekspresję E-kadheryny (APC-A +) i N-kadheryny (PE-A +) w komórkach linii A375 traktowanych MVEs z nieelektroporowanymi komórkami (MVEs – bez EP) oraz z komórkami traktowanych polem elektrycznym o natężeniu 800 (MVEs – 800 V/cm), 1200 (MVEs – 1200 V/cm) i 1600 V/cm (MVEs – 1600 V/cm).





**Rycina 26** Wykresy typu dot-plot przedstawiające ekspresję E-kadheryny (APC-A +) i N-kadheryny (PE-A +) w komórkach linii Me45 traktowanych MVEs z nieelektroporowanymi komórkami (MVEs – bez EP) oraz z komórek traktowanych polem elektrycznym o natężeniu 800 (MVEs – 800 V/cm), 1200 (MVEs – 1200 V/cm) i 1600 V/cm (MVEs – 1600 V/cm).



**Rycina 27** Wykresy typu dot-plot przedstawiające ekspresję E-kadheryny (APC-A +) i N-kadheryny (PE-A +) w komórkach linii A375 traktowanych MVEs z nieelektroporowanych komórek (MVEs – bez EP) oraz z komórek traktowanych polem elektrycznym o natężeniu 800 (MVEs – 800 V/cm), 1200 (MVEs – 1200 V/cm) i 1600 V/cm (MVEs – 1600 V/cm).

## 6 DYSKUSJA

---

Odwracalna elektroporacja (EP) to dobrze poznana metoda, która umożliwia łatwiejsze wprowadzenie leku lub materiału genetycznego do komórki, nie wpływając na jej żywotność (82). Elektrochemioterapia (ECT) odnosi się do leczenia skojarzonego, czyli połączenia EP i podawania leku przeciwnowotworowego, w celu zwiększenia jego stężenia wewnątrz komórki, a tym samym spotęgowania efektów jego działania. Jako mało inwazyjne leczenie, ECT zyskuje na popularności w Stanach Zjednoczonych (USA) i Europie Zachodniej, co jest również wynikiem dynamicznego postępu technologicznego oraz nieustających badań naukowych, dzięki którym możliwe jest jej ciągle udoskonalanie w praktyce klinicznej. Co ciekawe, w Polsce ECT jest również bardzo popularna w weterynarii, stając się terapią pierwszego rzutu ze względu na wysoką skuteczność i niskie koszty leczenia (83,84).

Jednakże stosowanie impulsów elektrycznych w ECT ma na celu nie tylko spowodowanie zwiększonej akumulacji leku wewnątrz komórek poprzez ułatwione przenikanie przez błony biologiczne. Błędne jest założenie, że śmierć komórek nowotworowych i jej rodzaj zależą jedynie od rodzaju podawanego leku i jego sposobu działania. Innymi głównymi mechanizmami przyczyniającymi się do sukcesu terapii i jej synergistycznego charakteru jest wpływ pola elektrycznego na naczynia krwionośne oraz na indukowanie odpowiedzi immunologicznej(85). Ekspozycja guza na EP wywołuje zjawisko określane jako blokada naczyniowa (86). Po dożylnym podaniu chemioterapeutyku, a następnie wykonaniu EP, dochodzi do lokalnego skurczu naczyń krwionośnych i zmniejszenia przepływu krwi w obrębie obszaru ablacji, co powoduje miejscową koncentrację leku i jednocześnie ogranicza jego rozprzestrzenianie się po organizmie (87). Dodatkowo dochodzi do niedokrwienia i niedotlenienia tkanki nowotworowej. Sumując te i inne efekty samej EP, impulsy elektryczne dostarczane do tkanek tworzą mikrośrodowisko zapalne, które ułatwia m.in. infiltrację i rekrutację komórek układu odpornościowego, co ma kluczowe znaczenie dla długoterminowej efektywności terapii(88). Badania eksperymentalne potwierdzają występowanie nie tylko apoptozy, ale również nekroptozy i immunogennej śmierci komórkowej (ang. *immunogenic cell death - ICD*), która aktywuje i podtrzymuje

odpowieź immunologiczną przeciwko komórkom nowotworowym (89–91). Odkrycie i potwierdzenie tego wielokierunkowego działania impulsów elektrycznych na komórki nowotworowe poskutkowało pewnym trendem wśród naukowców zajmujących się tą tematyką i odzwierciedla rosnące przekonanie, że poznanie molekularnych mechanizmów śmierci komórkowej i odpowiedzi immunologicznej może być kluczowe dla rozwoju skuteczniejszych metod leczenia onkologicznego (85,92).

Jednym z najczęściej leczonych metodą ECT nowotworów złośliwych jest czerniak, głównie ze względu na jego częste umiejscowienie w skórze (93–95). Umożliwia to klinicytom wykonanie mało inwazyjnego zabiegu dzięki przezskórnym elektrodom i łatwemu dożylnemu czy śródguzowemu podaniu chemioterapeutyku. Ekspozycja komórek nowotworowych na impulsy elektryczne połączona z chemioterapią wiąże się również z niewielkim uszkodzeniem skóry i minimalnym bliznowaceniem w przeciwieństwie do często stosowanej resekcji czerniaka (96). Co najważniejsze, umożliwia leczenie litych i rozsianych nowotworów, które są nieoperacyjne ze względu na stopień zaawansowania czy umiejscowienie blisko delikatnych struktur, takich jak ważniejsze naczynia krwionośne i nerwy.

Elektrochemioterapia jest uznawana nie tylko za skuteczną metodę leczenia różnego rodzaju nowotworów, ale też za stosunkowo bezpieczną dla pacjenta. Główne efekty uboczne, które mogą wpłynąć na proces leczenia pacjenta i jego dalszą rekonwalescencję, są związane z aplikacją impulsów elektrycznych. Jak w przypadku każdej inwazyjnej metody, przezskórna aplikacja zawsze wiąże się z ryzykiem infekcji i krwawienia, co również może prowadzić do pojawienia się uczucia dyskomfortu lub nawet bólu u pacjenta. Elektroporacja tkanek to też ryzyko pojawienia się miejscowych, mimowolnych skurczów mięśni (97). W rzadkich przypadkach stosowanie impulsów może wpływać na rytm serca, szczególnie gdy procedura jest wykonywana w jego bliskiej okolicy w klatce piersiowej (98,99).

Niniejsza rozprawa stanowi połączenie dwóch wyżej przedstawionych kwestii: bezpieczeństwa stosowania elektrochemioterapii w ujęciu komórkowo-molekularnym. W ramach pracy podjęta została próba wyjaśnienia, jak stosowanie odwracalnej elektroporacji wpływa na komunikację między komórkami nowotworowymi i ich procesy biologiczne. Tematyka została zawężona do kwestii nośników informacji międzykomórkowej, jakimi są mikropęcherzyki pozakomórkowe (EVs). Ze względu na wciąż dużą różnorodność tych mediatorów, eksperymenty ograniczono do struktur o średnicy powyżej 100 nm, czyli mikropęcherzyków (MVEs), struktur mniej badanych i poznanych niż egzosomy (EXs).

Jednym z głównych powodów było też zbadanie EP odwracalnej, która wpływa przede wszystkim na błonę komórkową, czyli miejsce powstawania MVEs.

We wstępnych badaniach udało się potwierdzić zastosowanie odwracalnej EP na komórkach czerniaka linii A375 i Me45 oraz keratynocytach linii HaCaT. Parametry EP zastosowane w przeprowadzonych badaniach zostały starannie dobrane na podstawie przeglądu literatury naukowej i wytycznych European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy (ESOPE). Wykorzystano dane z badań *in vitro*, jak również uwzględniono obserwacje z przypadków klinicznych, gdzie ECT była stosowana u pacjentów z czerniakiem (93,94,96,100). W przeprowadzonym teście PrestoBlue™ największy spadek przeżywalności komórek czerniaka (o 17,24%), zgodnie z oczekiwaniem, zanotowano dopiero po 72-godzinnej inkubacji w przypadku stosowania pola elektrycznego o najwyższym wybranym natężeniu 1600 V/cm u linii A375.

Najczęściej EP jest stosowana jako technika umożliwiająca pokonanie bariery jaką są błony biologiczne, co umożliwia wprowadzenie różnego rodzaju cząsteczek hydrofobowych do wnętrza komórki. Niemniej jednak utworzenie porów umożliwia komórce wymianę substancji dwukierunkowo, zgodnie ze zjawiskiem dyfuzji. Wykonanie elektroekstrakcji potwierdziło to twierdzenie oraz dostarczyło dowodów, że jej intensywność jest różna w zależności od zastosowanego napięcia pola elektrycznego, zazwyczaj zwiększa się wraz ze wzrostem natężenia pola elektrycznego. Podobne rezultaty uzyskali Šatkauskas i wsp., którzy zbadali wpływ natężenia pola elektrycznego, liczby impulsów i czasu ich trwania (101). Potwierdzili, że wydajność elektroekstrakcji kalceiny jest tym wyższa, im bardziej szkodliwe były warunki elektroporacji dla badanych komórek. Wyniki uzyskane dzięki systemowi Incucyte® wskazują również, że dynamika wypływu kalceiny z wnętrza komórki różni się między badanymi liniami komórkowymi. Prawdopodobnie jest to uwarunkowane unikalnymi cechami budowy komórki, w tym jej kształtu i rozmiaru, charakterem cytoszkieletu i białek powierzchniowych, które też ulegają zmianom pod wpływem przykładanego pola elektrycznego (102,103).

Izolacja mikropęcherzyków pozakomórkowych wciąż stanowi wyzwanie dla wielu badaczy zajmujących się tą tematyką. Mimo ogromnej liczby artykułów i badań, wciąż brakuje znormalizowanego i zwalidowanego protokołu dla każdego rodzaju EVs. Choć wirowanie sekwencyjne pozostaje najczęściej stosowaną metodą oczyszczania MVEs, wiąże się z kilkoma ograniczeniami, tj. niską wydajnością pozyskiwanego materiału i zanieczyszczeniami pozostałościami komórek (104). Wpływ na końcowy efekt mają przede

wszystkim prędkość wirowania, jego czas, temperatura izolacji, a także typ wykorzystywanej wirówki (105). Parametry te są dostosowywane do materiału biologicznego i rodzaju komórek od których są pozyskiwane MVEs (106).

W ramach tej pracy wykorzystano protokół izolacji zaproponowany przez dr Federikę Felicetti z dwoma zmianami: zakończeniem izolacji po drugim wirowaniu i zebraniu powstałego peletu MVEs oraz utrzymywaniem stałej temperatury 4°C podczas całej procedury (81). Wyniki cytometrii przepływowej z wykorzystaniem kulek kalibracyjnych ApogeeMix i kalceiny, zdjęcia wykonane dzięki transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz analiza ilościowa cząsteczki CD63 potwierdziły, że wykorzystany protokół pozwolił uzyskać zamknięte błoniaste struktury o wielkości MVEs. Ponadto, badania te pozwoliły uzyskać ogląd na wielkość i morfologię tych struktur, ukazując, jak bardzo jest to heterogeniczna grupa.

W obecnym stanie wiedzy brakuje jednoznacznych dowodów naukowych na temat wpływu EP na uwalnianie mikropęcherzyków pozakomórkowych. Chociaż istnieją badania wskazujące na potencjalne związki między elektroporacją a mechanizmami transportu wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego, są to głównie doniesienia na temat lizosomów i innych wewnątrzkomórkowych pęcherzyków wydzielniczych (107,108). Analiza cytometryczna MVEs wykonana po 2 i 24 godzinach od zastosowania EP na komórkach, z których pozyskiwano mikropęcherzyki, ukazała wyraźną zależność między ich ilością a wielkością wykorzystywanego natężenia pola elektrycznego. Zespół Andrew, badając wpływ uszkodzenia błony komórkowej na egzocytozę lizosomalną, doszedł do podobnych wniosków – działanie impulsów elektrycznych powoduje zaburzenia w tym procesie i skutkuje zwiększonym uwalnianiem lizosomów, proporcjonalne do stopnia uszkodzenia błony biologicznej (108). Porównując do siebie wyniki uzyskane po 2 i po 24 godzinach od EP, widoczne jest statystycznie istotne zwiększenie się liczby MVEs w porównaniu do kontroli. To sugeruje, że sama EP stymuluje komórkę do zwiększonego uwalniania MVEs nie tylko podczas permabilizacji błony komórkowej i jej powtórnej reorganizacji, ale również po zaniku bezpośredniego działania impulsów elektrycznych, co obrazuje ich utrzymującą się „nadprodukcję”.

Wynik cytometrii przepływowej dostarczył również dowodów, że zastosowanie impulsów elektrycznych nie ma większego wpływu na średnicę uwalnianych przez komórki MVEs. We wszystkich badanych liniach nie zanotowano istotnych statystycznie odstępstw w wielkości w porównaniu do mikropęcherzyków uwalnianych z komórek kontrolnych.

Zbliżone pomiary uzyskano również techniką DLS. W obu przypadkach uzyskane dane wskazywały, że najliczniejszą grupę stanowią MVEs o rozmiarach mniejszych niż 400 nm, a uzyskany rozkład wielkości o heterogeniczności badanych struktur, co również jest widoczne na zdjęciach wykonanych transmisyjnym mikroskopem elektronowym (**Rycina 12**).

Analiza ilościowa białka powierzchniowego CD63 dostarczyła istotnych danych potwierdzających obecność tych struktur w badanym materiale. Otrzymane wyniki ukazały również, że stosowanie wyższych parametrów zewnętrznego pola elektrycznego powoduje zwiększenie jego stężenia i/lub ekspresji w badanych próbkach. Wcześniejsze badania opisywane w literaturze wskazują na korelację pomiędzy wysokim poziomem cząsteczek CD63-pozytywnych a gorszym rokowaniem u pacjentów onkologicznych, co sugeruje potencjalną rolę MVEs we wpływaniu na agresywność nowotworu i jego zdolność do metastazowania(109–111).

Celem dalszych przeprowadzonych w ramach tej rozprawy badań *in vitro* było zamodelowanie sytuacji zachodzącej podczas elektroporacji guza czerniaka wykonywanej w praktyce klinicznej. W trakcie tego zabiegu, elektroporowane komórki nowotworowe uwalniają MVEs do przestrzeni międzykomórkowej, co może wpływać na biologiczne funkcje, rozwój i interakcje okolicznych komórek nowotworowych. Badania te miały na celu określenie, czy mikropęcherzyki mogą modulować lokalne środowisko nowotworowe, potencjalnie przyczyniając się do progresji choroby.

Zgodnie z oczekiwaniami, dane uzyskane w teście PrestoBlue™ potwierdziły doniesienia literaturowe, że MVEs izolowane z nieelektroporowanych komórek linii A375 i Me45 powodują zwiększenie się proliferacji komórek o odpowiednio 18,59% i 22,65%. Natomiast zastosowanie elektroporacji przed izolacją mikropęcherzyków doprowadziło do zmniejszenia tego efektu, a nawet w niektórych przypadkach do jego odwrócenia, co było nieoczekiwanym wynikiem i jednocześnie obiecującą wiadomością. Mimo że, jak zostało to potwierdzone we wcześniejszych badaniach, uprzednia EP komórek, z których pozyskuje się MVEs, powoduje zwiększone ich wydzielanie, to charakter tych cząsteczek jest odmienny i prezentuje inne działanie biologiczne.

Celem dalszego badania właściwości izolowanych MVEs, wykonano dwa eksperymenty oceniające ich wpływ na właściwości migracyjne i adhezyjne komórek: test zarastania rany oraz pomiar impedancji komórkowej.

Test zarastania rany potwierdził wstępne przypuszczenia o odmiennym, hamującym proliferację i migrację, działaniu MVEs pozyskanych z elektroporowanych komórek u wszystkich badanych linii, zarówno nowotworowych, jak i prawidłowych. Analiza zdjęć ukazała różnice pomiędzy badanymi warunkami już w pierwszych godzinach trwania eksperymentu (**Rycina 17**). Pomiary indeksu komórkowego systemem RTCA-iCELLigence potwierdziły wynik analizy migracji również wskazując na zmniejszenie mobilności komórek w przypadku linii A375 i HaCaT. Na linię Me45 wpływ MVEs w kontekście od komórek elektroporowanych był marginalny.

Kolejnym z badań wykonanych w ramach tej rozprawy była analiza poziomu całkowitej kinazy ogniskowo-adhezyjnej (FAK). Otrzymane wyniki jednoznacznie potwierdziły, że obecność MVEs zarówno z komórek elektroporowanych, jak i nieelektroporowanych, nie zwiększa stężenia tej kinazy, która jest jednym z kluczowych enzymów, który reguluje sygnały związane z przetrwaniem komórek, cyklem komórkowym, migracją i adhezją, a także z formowaniem immunosupresyjnego mikrośrodowiska nowotworowego. W przypadku linii A375 i Me45, porównując efekty działania MVEs w stosunku do komórek kontrolnych, zanotowano nawet obniżenie się poziomu kinazy FAK, co jest obiecującym czynnikiem prognostycznym. Zmniejszenie aktywności FAK w komórkach nowotworowych może przyczynić się do zmniejszonej migracji i inwazji komórkowej poprzez wpływ na sygnalizację międzykomórkową (112). Ponadto, FAK wpływa na przeżycie komórek nowotworowych przez modulowanie szlaków sygnalizacyjnych takich jak PI3K/AKT/mTOR, które są związane z promowaniem wzrostu nowotworowego i zapobieganiem apoptozie (113). Redukcja FAK może więc sprzyjać indukowaniu śmierci komórkowej, co jest pożądanym efektem w leczeniu przeciwnowotworowym. Udokumentowano też, że FAK współdziała z czynnikami wzrostu i różnymi komponentami mikrośrodowiska, co sugeruje, że zmniejszenie jego aktywności mogłoby modyfikować odpowiedź komórek na sygnały z ich otoczenia, potencjalnie zmniejszając ich zdolności metastatyczne oraz oporność na leczenie (114).

Badany analizą cytometryczną wpływ MVEs od nieelektroporowanych i elektroporowanych komórek na ekspresję kadheryn był odmienny w przypadku każdej linii. U linii A375 zmiany istotne statystycznie były widoczne jedynie w ekspresji N-kadheryny i potwierdziły, że zastosowanie EP spowodowało jej zwiększenie. Z kolei u drugiej linii czerniaka, Me45, nie zauważono żadnych jednoznacznych tendencji w ekspresji kadheryn. Komórki linii HaCaT okazały się najbardziej podatne na działanie MVEs, a zmiany



w ekspresji badanych białek transbłonowych były ściśle powiązane z zastosowanymi impulsami elektrycznymi i natężeniem zewnętrznego pola elektrycznego.

Według danych literaturowych, zwiększona ekspresja N-kadheryny u komórek nowotworowych jest związana z tendencją do tworzenia przerzutów poprzez m.in. ułatwienie komórkom migracji od guza pierwotnego i przeniknięcie do odległych miejsc w organizmie (115). W wielu przypadkach zwiększony poziom N-kadheryny jest związany z procesem zwanym przejściem epitelialno-mezenchymalnym (ang. *Epithelial-mesenchymal transition - EMT*) w którym to komórka o fenotypie epitelialnym upodabnia się wyglądem i zachowaniem do komórki mezenchymalnej, zyskując większą mobilność i inwazyjność (116). Utrata cech epitelialnych zazwyczaj jest też związana z obniżoną ekspresją charakterystycznych markerów tj. kładyn, okuldyn, kolagenu typu IV, laminy oraz E-kadheryny.

Analizując i porównując wyniki poziomów obu badanych kadheryn u HaCaT, potwierdzono, że pod wpływem MVEs pochodzących z komórek elektroporowanych, dochodzi do redukcji ekspresji E-kadheryny i zwiększenia ekspresji N-kadheryny (117). Zjawisko to nosi nazwę zmiany kadherynowej (ang. *cadherin switch*) i jest szczególnie istotne w kontekście EMT.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej jednoznacznie wskazują, że zastosowanie EP wpływa na charakter uwalnianych przez elektroporowane komórki mikropełcherzyki. Zestawiając wyniki testów proliferacji, zarastania ran i pomiarów impedancji, widać wyraźną u komórek tendencję do spowolnienia żywotności, migracji i adhezji pod wpływem badanych mikropełcherzyków. Zjawisko to można porównać do efektu świadka (*bystander effect*), który opisuje sytuację, gdzie komórki niebezpośrednio narażone na działanie terapeutyczne (np. promieniowanie lub substancje chemiczne) również wykazują zmiany wynikające z ekspozycji pobliskich komórek (118–120). W kontekście elektroporacji i MVEs, efekt świadka może być pośredniczony właśnie przez mikropełcherzyki, które transportują czynniki sygnalizacyjne między komórkami, wpływając na ich zachowanie nawet jeśli nie były bezpośrednio elektroporowane. Otrzymane wyniki pochodzące od nich wnioski są spójne z pracą Prevc i wsp., gdzie potwierdzono występowanie efektu świadka u jednej z badanych linii komórkowych (120). Brak tego efektu w innych badanych liniach komórkowych argumentowano ich niższą elektrowrażliwością co sprowadza się do wniosku, że zjawisko to jest zależne od zastosowanych parametrów przykładanego zewnętrznego pola elektrycznego.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że MVEs wydzielane przez komórki nowotworowe poddane elektroporacji, mogą wywoływać efekt świadka, wpływając na zmiany w komórkach sąsiadujących. Obserwacja, że mikropęcherzyki mogą modulować środowisko nowotworowe na odległość, jest obiecującym odkryciem, które może mieć znaczące implikacje kliniczne. Co istotne, badania potwierdzają bezpieczeństwo stosowania ECT w kontekście braku zagrożenia powstawania nowych ognisk przerzutu, co stanowi dobrą wiadomość dla pacjentów. Niemniej jednak, niepokojącym aspektem w kontekście bezpieczeństwa stosowania terapii jest wystąpienie u linii HaCaT zmiany kadherynowej, co może sugerować potencjalne zagrożenie związane z wystąpieniem procesu zwanego przejściem epitelialno-mezenchymalnym czyli ewentualną karcenogenezą komórek prawidłowych. Konieczne jest więc przeprowadzenie dalszych badań w tym kierunku.

Aby w pełni zrozumieć potencjał terapeutyczny i mechanizmy działania mikropęcherzyków, potrzebne są też badania na większej liczbie i różnorodności typów nowotworów. Ponadto, istotne będzie zbadanie innych podgrup mikropęcherzyków, takich jak egzosomy, które również mogą odgrywać kluczowe role w komunikacji międzykomórkowej w kontekście nowotworowym oraz inne parametry elektroporacji, np. stosowane w klinice lub jeszcze w testach przedklinicznych jak nanosekundowe pole elektryczne (ang. *Nanosecond pulsed electric field* – nsPEF). Rozszerzenie badań na te obszary pozwoli na lepsze zrozumienie złożoności mechanizmów regulacyjnych i potencjalnych ścieżek terapeutycznych, co jest niezbędne do optymalizacji strategii leczenia przeciwnowotworowego.

## 7 WNIOSKI

---

Na podstawie wyników otrzymanych w niniejszej pracy, sformułowano następujące wnioski:

1. W badaniu zastosowano elektroporację przy użyciu 8 impulsów elektrycznych, gdzie każdy z nich trwał 100  $\mu$ s, a częstotliwość ich powtarzania wynosiła 1 Hz przy napięciach 800, 1200 i 1600 V/cm. Zgodnie z oczekiwaniami, wybrane parametry przyczyniły się do osiągnięcia elektroporacji odwracalnej, co potwierdza ich skuteczność w indukowaniu tymczasowych zmian w przepuszczalności błony komórkowej bez trwałego uszkodzenia komórek.
2. Wybrany protokół izolacji opierający się na sekwencyjnym wirowaniu okazał się skuteczną i efektywną metodą pozyskiwania mikropęcherzyków (MVEs) o pożądanej wielkości. Zastosowanie tego protokołu umożliwiło selektywne oddzielenie MVEs od innych składników komórkowych, co znacząco przyczyniło się do poprawy jakości i powtarzalności uzyskanych próbek. Przeprowadzone analizy potwierdziły, że uzyskane MVEs zachowują swoje funkcjonalne właściwości.
3. Elektroporacja odwracalna komórek, z których izolowano MVEs, przyczyniła się do ich zwiększonego uwalniania. Zastosowane impulsy elektryczne nie miały istotnego wpływu na morfologię oraz średnicę tych struktur.
4. Badania przeżywalności, migracji i adhezji komórek wykazały, że mikropęcherzyki pochodzące z komórek poddanych elektroporacji wykazują działanie hamujące na te funkcje komórkowe w porównaniu do komórek kontrolnych, które nie były traktowane oraz do komórek traktowanych mikropęcherzykami z komórek nieelektroporowanych. Zaproponowanym wytłumaczeniem tego zjawiska jest efekt świadka (ang. *Bystander effect*), który może odpowiadać za obserwowane zmiany w zachowaniu komórek.
5. Przeprowadzone analizy wykazały, że mikropęcherzyki izolowane z komórek poddanych elektroporacji wpływają na ekspresję kadheryn, poziom kinazy ogniskowo-adhezyjnej (FAK) oraz ekspresję białka CD63 na powierzchni komórkowej. Efekty te są zależne od parametru elektroporacji, takiego jak natężenie pola elektrycznego oraz wykazują zróżnicowanie w zależności od badanej linii komórkowej.

## 8 STRESZCZENIE

---

Niniejsza rozprawa doktorska o tytule „*Wpływ elektroporacji na transport dwukierunkowy, procesy fizjologiczne oraz komunikację między komórkami nowotworowymi, badania in vitro*” koncentruje się na analizie wpływu mikropęcherzyków pozakomórkowych (MVEs), wydzielanych przez komórki nowotworowe poddane odwracalnej elektroporacji (EP), na różnorodne procesy biologiczne zachodzące w tkankach nowotworowych. Badania przeprowadzono w kontekście elektrochemioterapii (ECT), nowoczesnej metody leczenia nowotworów, która łączy stosowanie impulsów elektrycznych z podawaniem chemioterapeutyków, zwiększając ich efektywność dzięki lepszemu przenikaniu przez błony komórkowe.

W pierwszej części pracy przedstawiono ogólną charakterystykę elektroporacji i elektrochemioterapii, wskazując na ich rosnącą popularność w leczeniu nowotworów takich jak czerniak, ze względu na ich skuteczność i niskie koszty w porównaniu z tradycyjnymi metodami chirurgicznymi. Następnie skoncentrowano się na mikropęcherzykach pozakomórkowych, wskazując, że są one istotnym medium komunikacji międzykomórkowej, które może modulować lokalne środowisko nowotworowe i przyczyniać się do progresji choroby.

W ramach badań eksperymentalnych analizowano wpływ EP na wydzielanie MVEs przez linie komórek nowotworowych i prawidłowych, w tym keratynocyty (linia HaCaT) oraz komórki czerniaka (linie A375 i Me45). Przeprowadzone testy, w tym cytometria przepływowa oraz analizy molekularne, wykazały, że EP może zwiększać wydzielanie MVEs, które różnią się zarówno składem, jak i potencjalnym wpływem na procesy takie jak migracja, adhezja i proliferacja komórek. Zastosowanie EP przed izolacją MVEs skutkowało modulacją tych procesów.

Dodatkowo, badania skupiły się na analizie ekspresji kadheryn oraz kinazy ogniskowo-adhezyjnej (FAK), które są kluczowymi markerami procesów migracyjnych i adhezyjnych komórek nowotworowych. Wyniki wskazały na zmniejszenie aktywności FAK oraz zmiany w ekspresji N-kadheryny po zastosowaniu EP, co może mieć znaczący wpływ na zmniejszenie zdolności metastatycznych komórek nowotworowych.

Podsumowując, rozprawa dostarcza dowodów na to, że elektroporacja może być wykorzystywana nie tylko do zwiększenia efektywności chemioterapii, ale również do

modulacji środowiska nowotworowego poprzez kontrolę wydzielania i charakterystyk mikropęcherzyków pozakomórkowych. Odkrycia te otwierają nowe perspektywy dla terapii onkologicznych, które mogą wykorzystywać elektroporację jako strategię do regulowania mikrośrodowiska nowotworowego i hamowania progresji choroby.

## 9 ABSTRACT

---

This dissertation titled “*Impact of Electroporation on Bidirectional Transport, Physiological Processes, and Communication Between Cancer Cells: In Vitro Studies*” focuses on the analysis of the impact of extracellular microvesicles (MVEs) released by cancer cells subjected to reversible electroporation (EP) on various biological processes occurring in tumor tissues. The study is contextualized within electrochemotherapy (ECT), a modern cancer treatment method that combines the use of electric pulses with the administration of chemotherapeutics, enhancing their efficacy by improving penetration through cellular membranes.

The first part of the work presents a general characterization of electroporation and electrochemotherapy, highlighting their growing popularity in the treatment of cancers such as melanoma due to their effectiveness and low costs compared to traditional surgical methods. The focus then shifts to extracellular microvesicles, pointing out that they are a significant medium of intercellular communication, which can modulate the local tumor environment and contribute to disease progression.

Experimental studies analyzed the impact of EP on the secretion of MVEs by both cancerous and normal cell lines, including keratinocytes (HaCaT line) and melanoma cells (A375 and Me45 lines). Conducted tests, including flow cytometry and molecular analyses, showed that EP could increase the secretion of MVEs, which differ in both composition and potential impact on processes such as cell migration, adhesion, and proliferation. Using EP before isolating MVEs resulted in the modulation of these processes.

Additionally, the research focused on the analysis of cadherins and focal adhesion kinase (FAK) expression, which are key markers of migratory and adhesive processes in cancer cells. Results indicated a reduction in FAK activity and changes in N-cadherin expression following EP, which may significantly impact the reduction of metastatic abilities of cancer cells.

In summary, the dissertation provides evidence that electroporation can be utilized not only to enhance the efficacy of chemotherapy but also to modulate the tumor environment through the control of the secretion and characteristics of extracellular microvesicles. These findings open new perspectives for oncological therapies that could use electroporation as a strategy to regulate the tumor microenvironment and inhibit disease progression.



## 10 BIBLIOGRAFIJA

---

1. Neumann E, Rosenheck K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J Membr Biol* [Internet]. 1972 Dec [cited 2024 Sep 3];10(1):279–90. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01867861>
2. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* [Internet]. 1982 [cited 2024 Sep 3];1(7):841–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6329708/>
3. Kotnik T, Frey W, Sack M, Haberl Meglič S, Peterka M, Miklavčič D. Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2024 Sep 3];33(8):480–8. Available from: <http://www.cell.com/article/S0167779915001249/fulltext>
4. Kandušer M, Miklavčič D. Electroporation in biological cell and tissue: An overview. *Food Engineering Series* [Internet]. 2008 [cited 2024 Sep 3];1–37. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-79374-0\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-79374-0_1)
5. Cvetkoska A, Pirc E, Reberšek M, Magjarević RM, Miklavčič D. *IEEE Instrumentation & Measurement Magazine Towards Standardization of Electroporation Devices and Protocols*. 2020;(April).
6. Skořucka N, Saczko J, Kotulska M, Kulbacka J, Choromańska A. Electroporation and its application Elektroporacja i jej zastosowanie. *Pol Merk Lek*. 2010;168:501.
7. Weaver JC, Chizmadzhev Y. Electroporation. *Biological and Medical Aspects of Electromagnetic Fields* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2024 Sep 3];243–84. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781315186641-8/electroporation-james-weaver-yuri-chizmadzhev>
8. Jiang C, Davalos R V., Bischof JC. A review of basic to clinical studies of irreversible electroporation therapy. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2015 Jan 1;62(1):4–20.
9. Cemazar M, Sersa G. Recent Advances in Electrochemotherapy. <https://home.liebertpub.com/bioe> [Internet]. 2019 Dec 12 [cited 2024 Sep 3];1(4):204–13. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/bioe.2019.0028>
10. Miklavčič D, Mali B, Kos B, Heller R, Serša G. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *BioMedical Engineering OnLine* 2014 13:1 [Internet]. 2014 Mar 12 [cited 2024 Sep 3];13(1):1–20. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/1475-925X-13-29>



11. Maglietti F, Tellado M, Olaiz N, Michinski S, Marshall G. Combined local and systemic bleomycin administration in electrochemotherapy to reduce the number of treatment sessions. *Radiol Oncol*. 2016 Mar 1;50(1):58–63.
12. Mir LM. Bases and rationale of the electrochemotherapy. *European Journal of Cancer, Supplement*. 2006;4(11):38–44.
13. Sersa G, Miklavcic D, Cemazar M, Rudolf Z, Pucihar G, Snoj M. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2008 Feb 1;34(2):232–40.
14. Bendix MB, Brint E, Forde PF. Electroporation of suspension cell lines – A proposed assay set for optimizations. *Bioelectrochemistry*. 2021 Dec 1;142:107891.
15. Wichtowski M, Murawa D. Electrochemotherapy in the treatment of melanoma. *Wspolczesna Onkologia*. 2018;22(1):8–13.
16. Condello M, D’Avack G, Spugnini EP, Meschini S. Electrochemotherapy: An Alternative Strategy for Improving Therapy in Drug-Resistant SOLID Tumors. *Cancers (Basel)*. 2022;14(17):1–16.
17. Gehl J. Electroporation: Theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand*. 2003;177(4):437–47.
18. Lee AG. Biological membranes: The importance of molecular detail. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2011 Sep 1 [cited 2024 Sep 3];36(9):493–500. Available from: <http://www.cell.com/article/S0968000411000983/fulltext>
19. Watson H. Biological membranes. *Essays Biochem* [Internet]. 2015 Nov 15 [cited 2024 Sep 3];59:43–70. Available from: </essaysbiochem/article/doi/10.1042/bse0590043/88342/Biological-membranes>
20. Andreucci D, Bellaveglia D, Cirillo ENM. A model for enhanced and selective transport through biological membranes with alternating pores. *Math Biosci*. 2014 Nov 1;257:42–9.
21. Akimov SA, Volynsky PE, Galimzyanov TR, Kuzmin PI, Pavlov K V., Batishchev O V. Pore formation in lipid membrane II: Energy landscape under external stress. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2024 Sep 3];7(1). Available from: </pmc/articles/PMC5624950/>
22. Tarek M. Membrane electroporation: A molecular dynamics simulation. *Biophys J* [Internet]. 2005 Jun 1 [cited 2024 Sep 3];88(6):4045–53. Available from: <http://www.cell.com/article/S000634950573455X/fulltext>

23. Kotnik T, Rems L, Tarek M, Miklavcic D. Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models. *Annu Rev Biophys* [Internet]. 2019 May 6 [cited 2024 Sep 3];48(Volume 48, 2019):63–91. Available from: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-biophys-052118-115451>
24. Kulbacka J, Rembiałkowska N, Szewczyk A, Rossowska J, Drąg-Zalesińska M, Kulbacki M, et al. Nanosecond PEF Induces Oxidative Stress and Apoptosis via Proteasomal Activity Inhibition in Gastric Adenocarcinoma Cells with Drug Resistance. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 12943 [Internet]. 2022 Oct 26 [cited 2024 Sep 3];23(21):12943. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/21/12943/htm>
25. Rembiałkowska N, Szlasa W, Radzevičiūtė-Valčiukė E, Kulbacka J, Novickij V. Negative effects of cancellation during nanosecond range High-Frequency calcium based electrochemotherapy in vitro. *Int J Pharm.* 2023 Dec 15;648:123611.
26. Rembiałkowska N, Novickij V, Baczyńska D, Dubińska-Magiera M, Saczko J, Rudno-Rudzińska J, et al. Micro- and Nanosecond Pulses Used in Doxorubicin Electrochemotherapy in Human Breast and Colon Cancer Cells with Drug Resistance. *Molecules* 2022, Vol 27, Page 2052 [Internet]. 2022 Mar 22 [cited 2024 Sep 3];27(7):2052. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/7/2052/htm>
27. Beebe SJ. Considering effects of nanosecond pulsed electric fields on proteins. *Bioelectrochemistry.* 2015 Jun 1;103:52–9.
28. Kulbacka J, Rembiałkowska N, Szewczyk A, Rossowska J, Drąg-Zalesińska M, Kulbacki M, et al. Nanosecond PEF Induces Oxidative Stress and Apoptosis via Proteasomal Activity Inhibition in Gastric Adenocarcinoma Cells with Drug Resistance. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21).
29. Sulaeman MY, Widita R. Modeling in conventional and supra electroporation for model cell with organelles. *AIP Conf Proc.* 2015;1677:1–5.
30. Weaver JC, Smith KC, Esser AT, Son RS, Gowrishankar TR. A brief overview of electroporation pulse strength-duration space: A region where additional intracellular effects are expected. *Bioelectrochemistry* [Internet]. 2012;87:236–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.02.007>
31. Esser AT, Smith KC, Gowrishankar TR, Vasilkoskl Z, Weaver JC. Mechanisms for the intracellular manipulation of organelles by conventional electroporation. *Biophys J* [Internet]. 2010;98(11):2506–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2010.02.035>

32. Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 2010 463:7280 [Internet]. 2010 Jan 27 [cited 2024 Aug 30];463(7280):485–92. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature08908>
33. Graybill PM, Davalos R V. Cytoskeletal disruption after electroporation and its significance to pulsed electric field therapies. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5):29–32.
34. Pakhomov AG, Xiao S, Pakhomova ON, Semenov I, Kuipers MA, Ibey BL. Disassembly of actin structures by nanosecond pulsed electric field is a downstream effect of cell swelling. *Bioelectrochemistry*. 2014 Dec 1;100:88–95.
35. Thompson GL, Roth CC, Dalzell DR, Kuipers MA, Ibey BL. Calcium influx affects intracellular transport and membrane repair following nanosecond pulsed electric field exposure. <https://doi.org/10.1117/1JBO195055005> [Internet]. 2014 May 13 [cited 2024 Aug 30];19(5):055005. Available from: <https://www.spiedigitallibrary.org/journals/journal-of-biomedical-optics/volume-19/issue-5/055005/Calcium-influx-affects-intracellular-transport-and-membrane-repair-following-nanosecond/10.1117/1.JBO.19.5.055005.full>
36. Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2024 Aug 30];94(1):235–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24382887/>
37. Kanthou C, Kranjc S, Sersa G, Tozer G, Zupanic A, Cemazar M. The endothelial cytoskeleton as a target of electroporation-based therapies. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2006 Dec 1 [cited 2024 Aug 30];5(12):3145–52. Available from: </mct/article/5/12/3145/235220/The-endothelial-cytoskeleton-as-a-target-of>
38. Pehlivanova VN, Tsoneva IH, Tzoneva RD. Multiple effects of electroporation on the adhesive behaviour of breast cancer cells and fibroblasts. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2012 Mar 22 [cited 2024 Aug 30];12(1):1–14. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/1475-2867-12-9>
39. Szewczyk A, Gehl J, Daczewska M, Saczko J, Frandsen SK, Kulbacka J. Correction: Calcium electroporation for treatment of sarcoma in preclinical studies. *Oncotarget* [Internet]. 2019 Aug 8 [cited 2024 Aug 30];10(49):5118. Available from: </pmc/articles/PMC6707949/>
40. Markelc B, Bellard E, Sersa G, Jesenko T, Pelofy S, Teissié J, et al. Increased permeability of blood vessels after reversible electroporation is facilitated by alterations in endothelial cell-to-cell junctions. *Journal of Controlled Release* [Internet]. 2018;276:30–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.032>

41. Nehme Z, Roehlen N, Dhawan P, Baumert TF. Tight Junction Protein Signaling and Cancer Biology. *Cells* 2023, Vol 12, Page 243 [Internet]. 2023 Jan 6 [cited 2024 Aug 31];12(2):243. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/12/2/243/htm>
42. Ribatti D. An historical note on the cell theory. *Exp Cell Res*. 2018 Mar 1;364(1):1–4.
43. Bielańska-Osuchowska Z. Pozakomórkowe mikropęcherzyki jako system komunikacji między komórkami. *Encyclopedia of Cell Biology*. 2016;2(1):302–10.
44. Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2005 Feb 20 [cited 2024 Sep 1];113(5):752–60. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.20657>
45. Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan MLG, Stolz DB, Papworth GD, et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* [Internet]. 2004 Nov 15 [cited 2024 Sep 1];104(10):3257–66. Available from: <https://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-03-0824>
46. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2011 68:16 [Internet]. 2011 May 11 [cited 2024 Sep 1];68(16):2667–88. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-011-0689-3>
47. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1).
48. Zhou E, Li Y, Wu F, Guo M, Xu J, Wang S, et al. Circulating extracellular vesicles are effective biomarkers for predicting response to cancer therapy-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). *EBioMedicine* [Internet]. 2021 [cited 2024 Sep 1];67:103365. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103365>
49. Shapiro JA. No genome is an island: toward a 21st century agenda for evolution. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2024 Sep 1];1447(1):21–52. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/nyas.14044>
50. Raposo G, Stahl PD. Extracellular vesicles: a new communication paradigm? *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2019;20(9):509–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0158-7>

51. Borzdziłowska Paulina, Bednarek Ilona. Biogeneza i znaczenie egzosomów w komunikacji międzykomórkowej, w wybranych procesach fizjologicznych, i w nowotworzeniu. *Postępy Biologii Komórki*. 2021;48(4):345–64.
52. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*. 2015;65(8):783–97.
53. Tricarico C, Clancy J, D’Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases* [Internet]. 2017;8(4):220–32. Available from: <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1215283>
54. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol* [Internet]. 2013 May 1 [cited 2024 Sep 2];113(1):1–11. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11060-013-1084-8>
55. Pilzer D, Gasser O, Moskovich O, Schifferli JA, Fishelson Z. Emission of membrane vesicles: Roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Semin Immunopathol* [Internet]. 2005 Nov 28 [cited 2024 Sep 2];27(3):375–87. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-005-0004-1>
56. Roberts CT, Kurre P. Vesicle trafficking and RNA transfer add complexity and connectivity to cell-cell communication. *Cancer Res* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2024 Sep 2];73(11):3200–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23695552/>
57. Than UTT, Guanzon D, Leavesley D, Parker T. Association of extracellular membrane vesicles with cutaneous wound healing. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5):1–20.
58. Aryani A, Denecke B. Exosomes as a Nanodelivery System: a Key to the Future of Neuromedicine? *Mol Neurobiol* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2024 Sep 3];53(2):818–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25502465/>
59. Prada I, Meldolesi J. Binding and Fusion of Extracellular Vesicles to the Plasma Membrane of Their Cell Targets. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016 Aug 9 [cited 2024 Sep 3];17(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27517914/>
60. Christianson HC, Svensson KJ, Van Kuppevelt TH, Li JP, Belting M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 Oct 22 [cited 2024 Sep 3];110(43):17380–5. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1304266110>
61. Janas AM, Sapoń K, Janas T, Stowell MHB, Janas T. Exosomes and other extracellular vesicles in neural cells and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2016

- Jun 1 [cited 2024 Sep 3];1858(6):1139–51. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26874206/>
62. Wang Z, Chen JQ, Liu J lu, Tian L. Exosomes in tumor microenvironment: Novel transporters and biomarkers. *J Transl Med* [Internet]. 2016 Oct 19 [cited 2024 Sep 4];14(1):1–9. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12967-016-1056-9>
  63. Papa A, Chen M, Pandolfi PP. Pills of PTEN? In and out for tumor suppression. *Cell Research* 2013 23:10 [Internet]. 2013 Aug 6 [cited 2024 Sep 4];23(10):1155–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/cr2013103>
  64. Ham S, Lima LG, Chai EPZ, Muller A, Lobb RJ, Krumeich S, et al. Breast cancer-derived exosomes alter macrophage polarization via gp130/STAT3 signaling. *Front Immunol* [Internet]. 2018 May 8 [cited 2024 Sep 4];9(MAY):332444. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
  65. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature Reviews Cancer* 2009 9:11 [Internet]. 2009 Nov [cited 2024 Sep 4];9(11):798–809. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc2734>
  66. Clayton A, Mitchell JP, Court J, Mason MD, Tabi Z. Human Tumor-Derived Exosomes Selectively Impair Lymphocyte Responses to Interleukin-2. *Cancer Res* [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2024 Sep 4];67(15):7458–66. Available from: [/cancerres/article/67/15/7458/533356/Human-Tumor-Derived-Exosomes-Selectively-Impair](http://cancerres/article/67/15/7458/533356/Human-Tumor-Derived-Exosomes-Selectively-Impair)
  67. Beckler MD, Higginbotham JN, Franklin JL, Ham AJ, Halvey PJ, Imasuen IE, et al. Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Molecular and Cellular Proteomics* [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2024 Sep 4];12(2):343–55. Available from: <http://www.mcponline.org/article/S1535947620332473/fulltext>
  68. Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, Allison AC, Rak A. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 Mar 10 [cited 2024 Sep 4];106(10):3794–9. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0804543106>
  69. Okusha Y, Eguchi T, Sogawa C, Okui T, Nakano K, Okamoto K, et al. The intranuclear PEX domain of MMP involves proliferation, migration, and metastasis of aggressive adenocarcinoma cells. *J Cell Biochem* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2024 Sep 4];119(9):7363–76. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.27040>

70. Conigliaro A, Costa V, Lo Dico A, Saieva L, Buccheri S, Dieli F, et al. CD90+ liver cancer cells modulate endothelial cell phenotype through the release of exosomes containing H19 lncRNA. *Mol Cancer* [Internet]. 2015 Aug 14 [cited 2024 Sep 4];14(1):1–11. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12943-015-0426-x>
71. Umezū T, Ohyashiki K, Kuroda M, Ohyashiki JH. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene* 2013 32:22 [Internet]. 2012 Jul 16 [cited 2024 Sep 4];32(22):2747–55. Available from: <https://www.nature.com/articles/onc2012295>
72. Mercier V, Larios J, Molinard G, Goujon A, Matile S, Gruenberg J, et al. Endosomal membrane tension regulates ESCRT-III-dependent intra-luminal vesicle formation. *Nature Cell Biology* 2020 22:8 [Internet]. 2020 Aug 3 [cited 2024 Sep 4];22(8):947–59. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41556-020-0546-4>
73. Sung BH, Ketova T, Hoshino D, Zijlstra A, Weaver AM. Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. *Nature Communications* 2015 6:1 [Internet]. 2015 May 13 [cited 2024 Sep 4];6(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms8164>
74. Hon KW, Abu N, Ab Mutalib NS, Jamal R. Exosomes as potential biomarkers and targeted therapy in colorectal cancer: A mini-review. *Front Pharmacol* [Internet]. 2017 Aug 28 [cited 2024 Sep 4];8(AUG):583. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
75. Shao Y, Chen T, Zheng X, Yang S, Xu K, Chen X, et al. Colorectal cancer-derived small extracellular vesicles establish an inflammatory premetastatic niche in liver metastasis. *Carcinogenesis* [Internet]. 2018 Dec 13 [cited 2024 Sep 4];39(11):1368–79. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgy115>
76. Hood JL, San Roman S, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2024 Sep 4];71(11):3792–801. Available from: [/cancerres/article/71/11/3792/657502/Exosomes-Released-by-Melanoma-Cells-Prepare](http://cancerres/article/71/11/3792/657502/Exosomes-Released-by-Melanoma-Cells-Prepare)
77. Weidle UH, Birzele F, Kollmorgen G, R ger R. The multiple roles of exosomes in metastasis. *Cancer Genomics Proteomics*. 2017;14(1):1–16.
78. Ifergan I, Scheffer GL, Assaraf YG. Novel Extracellular Vesicles Mediate an ABCG2-Dependent Anticancer Drug Sequestration and Resistance. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Dec 1 [cited 2024 Sep 4];65(23):10952–8. Available from: [/cancerres/article/65/23/10952/518775/Novel-Extracellular-Vesicles-Mediate-an-ABCG2](http://cancerres/article/65/23/10952/518775/Novel-Extracellular-Vesicles-Mediate-an-ABCG2)

79. Maacha S, Bhat AA, Jimenez L, Raza A, Haris M, Uddin S, et al. Extracellular vesicles-mediated intercellular communication: Roles in the tumor microenvironment and anti-cancer drug resistance. *Mol Cancer*. 2019;18(1):1–16.
80. Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature Reviews Cancer* 2018 18:7 [Internet]. 2018 Apr 11 [cited 2024 Sep 4];18(7):452–64. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41568-018-0005-8>
81. Felicetti F, De Feo A, Coscia C, Puglisi R, Pedini F, Pasquini L, et al. Exosome-mediated transfer of miR-222 is sufficient to increase tumor malignancy in melanoma. *J Transl Med*. 2016 Dec 24;14(1):56.
82. Probst U, Fuhrmann I, Beyer L, Wiggermann P. Electrochemotherapy as a new modality in interventional oncology: A review. *Technol Cancer Res Treat*. 2018;17:1–12.
83. Tunikowska J, Rembiałkowska N, Michel O, Mączyńska J, Antończyk A, Prządka P, et al. Electrochemotherapy with Bleomycin Supported by NIRF Imaging with Indocyanine Green (ICG)—In Vitro and In Vivo Case Study. *Applied Sciences (Switzerland)*. 2023;13(4).
84. Kulbacka J, Paczuska J, Rembiałkowska N, Saczko J, Kiełbowicz Z, Kinda W, et al. Electrochemotherapy combined with standard and CO2 laser surgeries in canine oral melanoma. *Slovenian Veterinary Research*. 2017;54(4):181–6.
85. Lindelauf KHK, Baragona M, Lemainque T, Maessen RTH, Ritter A. Electrochemotherapy and Calcium Electroporation on Hepatocellular Carcinoma Cells: An In-Vitro Investigation. *Cardiovasc Intervent Radiol* [Internet]. 2024; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00270-024-03847-1>
86. Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM. Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [Internet]. 2002 Jan;1569(1–3):51–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416501002331>
87. Markelc B, Bellard E, Sersa G, Jesenko T, Pelofy S, Teissié J, et al. Increased permeability of blood vessels after reversible electroporation is facilitated by alterations in endothelial cell-to-cell junctions. *Journal of Controlled Release* [Internet]. 2018 Apr;276:30–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365918301081>
88. Longo F, Perri F, Caponigro F, Della Vittoria Scarpati G, Guida A, Pavone E, et al. Boosting the Immune Response with the Combination of Electrochemotherapy and Immunotherapy: A



- New Weapon for Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck? *Cancers* (Basel) [Internet]. 2020 Sep 28;12(10):2781. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/10/2781>
89. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2017 Feb 17;17(2):97–111. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri.2016.107>
  90. Mir LM, Calvet CY, Andre FM. Therapeutic effects of in vivo electroporation: Facilitating drug and gene delivery but not only.... In: 2014 XXXIth URSI General Assembly and Scientific Symposium (URSI GASS) [Internet]. IEEE; 2014. p. 1–3. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/6930082/>
  91. Ahmed A, Tait SWG. Targeting immunogenic cell death in cancer. *Mol Oncol* [Internet]. 2020 Dec;14(12):2994–3006. Available from: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1878-0261.12851>
  92. Miklavčič D, editor. *Handbook of Electroporation* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-32886-7>
  93. Petrelli F, Ghidini A, Simioni A, Campana LG. Impact of electrochemotherapy in metastatic cutaneous melanoma: a contemporary systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol (Madr)* [Internet]. 2022;61(5):533–44. Available from: <https://doi.org/10.1080/0284186X.2021.2006776>
  94. Goggins CA, Khachemoune A. The use of electrochemotherapy in combination with immunotherapy in the treatment of metastatic melanoma: a focused review. *Int J Dermatol*. 2019;58(8):865–70.
  95. Campana LG, Testori A, Mozzillo N, Rossi CR. Treatment of metastatic melanoma with electrochemotherapy. *J Surg Oncol*. 2014;109(4):301–7.
  96. Serša G, Štabuc B, Čemažar M, Miklavčič D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: Clinical experience in malignant melanoma patients. *Clinical Cancer Research*. 2000;6(3):863–7.
  97. Fusco R, Di Bernardo E, D'Alessio V, Salati S, Cadossi M. Reduction of muscle contraction and pain in electroporation-based treatments: An overview. *World J Clin Oncol* [Internet]. 2021 May 24;12(5):367–81. Available from: <https://www.wjgnet.com/2218-4333/full/v12/i5/367.htm>
  98. Deodhar A, Dickfeld T, Single GW, Hamilton WC, Thornton RH, Sofocleous CT, et al. Irreversible Electroporation Near the Heart: Ventricular Arrhythmias Can Be Prevented With

- ECG Synchronization. *American Journal of Roentgenology* [Internet]. 2011 Mar;196(3):W330–5. Available from: <https://www.ajronline.org/doi/10.2214/AJR.10.4490>
99. Kostrzewa M, Tueluemen E, Rudic B, Rathmann N, Akin I, Henzler T, et al. Cardiac impact of R-wave triggered irreversible electroporation therapy. *Heart Rhythm* [Internet]. 2018 Dec;15(12):1872–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1547527118306908>
100. Gehl J, Sersa G, Garbay J, Soden D, Rudolf Z, Marty M, et al. Results of the ESOPE (European Standard Operating Procedures on Electrochemotherapy) study: Efficient, highly tolerable and simple palliative treatment of cutaneous and subcutaneous metastases from cancers of any histology. *Journal of Clinical Oncology*. 2006 Jun 20;24(18\_suppl):8047–8047.
101. Rajeckaitė V, Jakštys B, Rafanavičius A, Maciulevičius M, Jakutavičiūtė M, Šatkauskas S. Calcein Release from Cells In Vitro via Reversible and Irreversible Electroporation. *J Membr Biol*. 2018 Feb 15;251(1):119–30.
102. Henslee BE, Morss A, Hu X, Lafyatis GP, Lee LJ. Electroporation dependence on cell size: Optical tweezers study. *Anal Chem*. 2011;83(11):3998–4003.
103. Graybill PM, Jana A, Kapania RK, Nain AS, Davalos R V. Single Cell Forces after Electroporation. *ACS Nano*. 2021;15(2):2554–68.
104. Nigro A, Finardi A, Ferraro MM, Manno DE, Quattrini A, Furlan R, et al. Selective loss of microvesicles is a major issue of the differential centrifugation isolation protocols. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83241-w>
105. Cvjetkovic A, Lötvall J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014;3(1):1–11.
106. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov A V., Laktionov PP. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *Biomed Res Int*. 2018;2018.
107. Schneider A, Rosenheck K. Intracellular Electroporation as Part of the Mechanism of Fusion Pore Formation in Exocytosis. *Biophys J* [Internet]. 2013 Jan;104(2):622a. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349512046887>
108. Huynh C, Roth D, Ward DM, Kaplan J, Andrews NW. Defective lysosomal exocytosis and plasma membrane repair in Chediak–Higashi/beige cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2004 Nov 30;101(48):16795–800. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0405905101>

109. Khushman M, Bhardwaj A, Patel GK, Laurini JA, Roveda K, Tan MC, et al. Exosomal Markers (CD63 and CD9) Expression Pattern Using Immunohistochemistry in Resected Malignant and Nonmalignant Pancreatic Specimens. *Pancreas* [Internet]. 2017 Jul;46(6):782–8. Available from: <https://journals.lww.com/00006676-201707000-00012>
110. Lewitowicz P, Matykiewicz J, Koziel D, Chrapek M, Horecka-Lewitowicz A, Gluszek S. CD63 and GLUT-1 Overexpression Could Predict a Poor Clinical Outcome in GIST: A Study of 54 Cases with Follow-Up. *Gastroenterol Res Pract* [Internet]. 2016;2016:1–8. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/grp/2016/6478374/>
111. Miki Y, Yashiro M, Okuno T, Kuroda K, Togano S, Hirakawa K, et al. Clinico-pathological significance of exosome marker CD63 expression on cancer cells and stromal cells in gastric cancer. Ahmad A, editor. *PLoS One* [Internet]. 2018 Sep 17;13(9):e0202956. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0202956>
112. Tan X, Yan Y, Song B, Zhu S, Mei Q, Wu K. Focal adhesion kinase: from biological functions to therapeutic strategies. *Exp Hematol Oncol* [Internet]. 2023 Sep 25;12(1):83. Available from: <https://ehoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40164-023-00446-7>
113. Kong DB, Chen F, Sima N. Focal adhesion kinases crucially regulate TGF $\beta$ -induced migration and invasion of bladder cancer cells via Src kinase and E-cadherin. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2017 Mar;Volume 10:1783–92. Available from: <https://www.dovepress.com/focal-adhesion-kinases-crucially-regulate-tgfbeta-induced-migration-an-peer-reviewed-article-OTT>
114. Chuang HH, Zhen YY, Tsai YC, Chuang CH, Hsiao M, Huang MS, et al. FAK in Cancer: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Feb 2;23(3):1726. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/3/1726>
115. Loh CY, Chai J, Tang T, Wong W, Sethi G, Shanmugam M, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells* [Internet]. 2019 Sep 20;8(10):1118. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/10/1118>
116. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2014 Mar 21;15(3):178–96. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm3758>
117. Huang H, Wright S, Zhang J, Brekken RA. Getting a grip on adhesion: Cadherin switching and collagen signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [Internet].

2019 Nov;1866(11):118472. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488919300734>

118. Ruzgys P, Barauskaitė N, Novickij V, Novickij J, Šatkauskas S. The evidence of the bystander effect after bleomycin electrotransfer and irreversible electroporation. *Molecules*. 2021;26(19):1–11.
119. Ruzgys P, Navickaitė D, Palepšienė R, Uždavinytė D, Barauskaitė N, Novickij V, et al. Induction of Bystander and Abscopal Effects after Electroporation-Based Treatments. *Cancers (Basel)*. 2022;14(15):1–17.
120. Prevc A, Bedina Zavec A, Cemazar M, Kloboves-Prevodnik V, Stimac M, Todorovic V, et al. Bystander Effect Induced by Electroporation is Possibly Mediated by Microvesicles and Dependent on Pulse Amplitude, Repetition Frequency and Cell Type. *J Membr Biol*. 2016 Oct 1;249(5):703–11.

## 11 SPIS RYCIN

---

<b>Rycina 1</b> "Mapa" w postaci wykresu w postaci wykresu logarytmicznego obrazująca efekty elektroporacji, które są zależne od zastosowanego natężenia pola elektrycznego i czasu trwania impulsu. Zmodyfikowano na podstawie (30).....	11
<b>Rycina 2</b> Struktura pozakomórkowego mikropęcherzyka z przykładowymi białkami powierzchniowymi i wewnętrznym cargo.....	14
<b>Rycina 3</b> Funkcje biologiczne cargo EVs zidentyfikowane w bazie danych Vesiclepedia. Zmodyfikowano na podstawie (81).....	15
<b>Rycina 4</b> Biogeneza egzosomów (EXs) i mikropęcherzyków (MVs). Zmodyfikowano na podstawie (57) .....	17
<b>Rycina 5</b> Proces izolacji MVEs z supernatantu elektroporowanych komórek.....	30
<b>Rycina 6</b> Przeżywalność komórek linii A375, Me45 i HaCaT wyznaczono testem PrestoBlue® po 24 (a) i 72 godzinach (b) od zastosowania elektroporacji wyrażona jako procent komórek kontrolnych. Słupki błędów to $\pm$ SD dla $n=3$ . Istotność statystyczną w odniesieniu do komórek kontrolnych danej linii wyznaczono jednoczynnikową analizą wariancji (test ANOVA) i testem Dunnetta, gdzie ** statystycznie istotne dla $p \leq 0,01$ , *** dla $p = 0,001$ i **** dla $p \leq 0,001$ .....	38
<b>Rycina 7</b> Analiza wydajności elektroekstrakcji kalceiny z komórek linii A375 po zastosowaniu impulsów elektrycznych. Kontrolę stanowią komórki nieelektroporowane. ....	39
<b>Rycina 8</b> Analiza wydajności elektroekstrakcji kalceiny z komórek linii Me45 po zastosowaniu impulsów elektrycznych. Kontrolę stanowią komórki nieelektroporowane. ....	40
<b>Rycina 9</b> Analiza wydajności elektroekstrakcji kalceiny z komórek linii HaCaT po zastosowaniu impulsów elektrycznych. Kontrolę stanowią komórki nieelektroporowane. ....	41
<b>Rycina 10</b> Histogramy obrazujące efektywność elektroekstrakcji tuż po zastosowaniu elektroporacji (górną rzęd) oraz 2 godziny później (dolny rząd). Kontrolę stanowiły komórki nie poddane działaniu pola elektrycznego.....	42
<b>Rycina 11</b> Średnie stężenia markera CD63 w próbkach zawierających MVEs wyizolowane z elektroporowanych komórek linii A375, Me45 oraz HaCaT. Kontrole stanowiły MVEs pochodzące	

z komórek nieelektroporowanych. Słupki błędów to  $\pm$  SD dla  $n=2$ . Istotność statystyczną w odniesieniu do komórek kontrolnych danej linii wyznaczono jednoczynnikową analizą wariancji (test ANOVA) i testem Dunnetta, gdzie \*\* statystycznie istotne dla  $p \leq 0,01$ . ..... 44

**Rycina 12** Obrazy z transmisyjnego mikroskopu elektronowego ukazujące wyizolowane MVEs pochodzące od linii A375 (górny rząd) i Me45 (dolny rząd) 24 godz. po wykonaniu EP. Widoczna na zdjęciach skala odpowiada 500 nm. Pomiary średnic (nm) poszczególnych MVEs wykonano w programie ImageJ (wersja 1.53C, <https://imagej.net/>)..... 46

**Rycina 13** Ilość MVEs pozyskanych po 2 (a) i 24 godzinach (b) od elektroporacji różnymi parametrami. Istotność statystyczną w odniesieniu do komórek kontrolnych danej linii wyznaczono jednoczynnikową analizą wariancji (test ANOVA) i testem Dunetta, gdzie \* statystycznie istotne dla  $p \leq 0,005$ , \*\* dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\* dla  $p = 0,001$  i \*\*\*\* dla  $p \leq 0,001$ ..... 47

**Rycina 14** Rozkład wielkości MVEs pochodzących od komórek linii A375 (a), Me45 (b) oraz HaCaT (c) w zależności od zastosowanego parametru EP. MVEs wyizolowano po 2 i 24 godzinach od zastosowania impulsów elektrycznych..... 49

**Rycina 15** Analiza wielkości MVEs techniką dynamicznego rozpraszania światła (DLS) pochodzących z komórek linii A375 (a), Me45(b) i HaCaT (c). Wykresy zostały wygenerowane w dedykowanym programie Zetasizer software (wersja 3.30). Wielkość „Intensity (Percent)” ukazuje jak różne rozmiary badanych cząstek przyczyniają się do ogólnej intensywności rozproszenia światła, co pozwala na analizę ich rozkładu wielkości w badanej próbce..... 50

**Rycina 16** Przeżywalność komórek linii A375, Me45 oraz HaCaT wyznaczona testem PrestoBlue po 72 godzinach od dodania MVEs do supernatantu badanych komórek. Istotność statystyczną w odniesieniu do komórek kontrolnych (Kontrola) i komórek traktowanych MVEs z nieelektroporowanych komórek (MVEs – bez EP) wyznaczono dwuczynnikową analizą wariancji (test ANOVA) i testem Tukeya, \* statystycznie istotne dla  $p \leq 0,005$ , \*\* dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\* dla  $p = 0,001$  i \*\*\*\* dla  $p \leq 0,001$ ..... 52

**Rycina 17** Analiza ilościowa zdolności komórek linii A375, Me45 i HaCaT do migracji i proliferacji. Komórki inkubowano z wyizolowanymi MVEs i analizowano przy pomocy programu ImageJ (wersja 1.53C, <https://imagej.net/>). Do celów statystycznych wykorzystano dwukierunkową analizę wariancji (ANOVA) z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego. \* statystycznie istotne dla  $p \leq 0,005$ , \*\* dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\* dla  $p = 0,001$  i \*\*\*\* dla  $p \leq 0,001$ ..... 53

**Rycina 18** Zdjęcia wykonane mikroskopem odwróconym (Leica) obrazujące migrację komórek linii A375 podczas 24-godzinowego testu zarastania rany. Analiza została wykonana programem ImageJ (wersja 1.52) z dedykowanym rozszerzeniem „Wound healing size tool”. ..... 55

**Rycina 19** Zdjęcia wykonane mikroskopem odwróconym (Leica) obrazujące migrację komórek linii Me45 podczas 72 -godzinowego testu zarastania rany. Analiza została wykonana programem ImageJ (wersja 1.52) z dedykowanym rozszerzeniem „Wound healing size tool”. ..... 56

**Rycina 20** Zdjęcia wykonane mikroskopem odwróconym (Leica) obrazujące migrację komórek linii HaCaT podczas 24-godzinowego testu zarastania rany. Analiza została wykonana programem ImageJ (wersja 1.52) z dedykowanym rozszerzeniem „Wound healing size tool”. ..... 57

**Rycina 21** Analiza zmian impedancji komórkowej linii A375, Me45 oraz HaCaT. Wykresy zostały wygenerowane w dedykowanym programie iCELLigence..... 59

**Rycina 22** Analiza ilościowa kinazy ogniskowej (FAK) w lizatach komórek poddanych działaniu MVEs pochodzących z komórek nieelektroporowanych (MVEs - bez EP) oraz z komórek elektroporowanych różnymi parametrami. Istotność statystyczną wyznaczono dwuczynnikową analizą wariancji (test ANOVA) i testem Tukeya, \* statystycznie istotne dla  $p \leq 0,005$ ..... 60

**Rycina 23** Analiza ilościowa E-kadheryny w komórkach linii A375, Me45 oraz HaCaT inkubowanych z wyizolowanymi MVEs pochodzącymi z komórek nieelektroporowanych (MVEs - bez EP) oraz elektroporowanych różnymi natężeniami pola elektrycznego. Istotność statystyczną wyznaczono dwuczynnikową analizą wariancji (test ANOVA) i testem Tukeya, \* statystycznie istotne dla  $p \leq 0,005$ , \*\* dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\* dla  $p = 0,001$  i \*\*\*\* dla  $p \leq 0,001$ ..... 61

<b>Rycina 24</b> Analiza ilościowa E-kadheryny w komórkach linii A375, Me45 oraz HaCaT inkubowanych z wyizolowanymi MVEs pochodzącymi z komórek nieelektroporowanych (MVEs - bez EP) oraz elektroporowanych różnymi natężeniami pola elektrycznego. Istotność statystyczną wyznaczono dwuczynnikową analizą wariancji (test ANOVA) i testem Tukeya, * statystycznie istotne dla $p \leq 0,005$ , ** dla $p \leq 0,01$ , *** dla $p = 0,001$ i **** dla $p \leq 0,001$ .....	63
<b>Rycina 25</b> Wykresy typu dot-plot przedstawiające ekspresję E-kadheryny (APC-A +) i N-kadheryny (PE-A +) w komórkach linii A375 traktowanych MVEs z nieelektroporowanych komórek (MVEs – bez EP) oraz z komórek traktowanych polem elektrycznym o natężeniu 800 (MVEs – 800 V/cm), 1200 (MVEs – 1200 V/cm) i 1600 V/cm (MVEs – 1600 V/cm). .....	64
<b>Rycina 26</b> Wykresy typu dot-plot przedstawiające ekspresję E-kadheryny (APC-A +) i N-kadheryny (PE-A +) w komórkach linii Me45 traktowanych MVEs z nieelektroporowanych komórek (MVEs – bez EP) oraz z komórek traktowanych polem elektrycznym o natężeniu 800 (MVEs – 800 V/cm), 1200 (MVEs – 1200 V/cm) i 1600 V/cm (MVEs – 1600 V/cm). .....	65
<b>Rycina 27</b> Wykresy typu dot-plot przedstawiające ekspresję E-kadheryny (APC-A +) i N-kadheryny (PE-A +) w komórkach linii A375 traktowanych MVEs z nieelektroporowanych komórek (MVEs – bez EP) oraz z komórek traktowanych polem elektrycznym o natężeniu 800 (MVEs – 800 V/cm), 1200 (MVEs – 1200 V/cm) i 1600 V/cm (MVEs – 1600 V/cm). .....	66

## 12 WYKAZ OSIĄGNIĘĆ

---

### 12.1 PUBLIKACJE W CZASOPISMIEM Z IF

1. Szwedowicz Urszula, Szewczyk Anna, Gołąb Krzysztof, Choromańska Anna: Evaluation of wound healing activity of salvianolic acid B on in vitro experimental model, *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, vol. 22, nr 14, 7728 [9 s.], DOI:10.3390/ijms22147728 2021 6,208 140 praca oryginalna
2. Sterczała Barbara, Chwiłkowska Agnieszka, Szwedowicz Urszula, Kobielarz Magdalena, Chwiłkowski Bartłomiej, Dominiak Marzena: Impact of APRF+ in combination with autogenous fibroblasts on release growth factors, collagen, and proliferation and migration of gingival fibroblasts: an in vitro study, *Materials*, 2022, vol. 15, nr 3, art.796 [11 s.], DOI:10.3390/ma15030796 2022 3,4 140 praca oryginalna
3. Szwedowicz Urszula, Łapińska Zofia, Gajewska-Naryniecka Agnieszka, Choromańska Anna: Exosomes and other extracellular vesicles with high therapeutic potential: their applications in oncology, neurology, and dermatology, *Molecules*, 2022, vol. 27, nr 4, art.1303 [34 s.], DOI:10.3390/molecules27041303 2022 4,6 140 praca przeglądowa
4. Łapińska Zofia, Szwedowicz Urszula, Choromańska Anna, Saczko Jolanta: Electroporation and electrochemotherapy in gynecological and breast cancer treatment, *Molecules*, 2022, vol. 27, nr 8, art.2476 [32 s.], DOI:10.3390/molecules27082476 2022 4,6 140 praca przeglądowa
5. Gajewska-Naryniecka Agnieszka, Szwedowicz Urszula, Łapińska Zofia, Rudno-Rudzińska Julia, Kielan Wojciech, Kulbacka Julita: Irreversible electroporation in pancreatic cancer - an evolving experimental and clinical method, *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 24, nr 5, art.4381 [19 s.], [Korekta afiliacji: J. Rudno-Rudzińska, W. Kielan], DOI:10.3390/ijms24054381 2023 4,9 140 praca przeglądowa
6. Radzka Justyna, Łapińska Zofia, Szwedowicz Urszula, Gajewska-Naryniecka Agnieszka, Gizak Agnieszka, Kulbacka Julita: Alternations of NF-κB signaling by natural compounds in muscle-derived cancers, *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 24, nr 15, art.11900 [15 s.], DOI:10.3390/ijms241511900 2023 4,9 140 praca przeglądowa
7. Szota Magdalena, Szwedowicz Urszula, Rembiałkowska Nina, Janicka-Kłos Anna, Doveiko Daniel, Chen Yu, Kulbacka Julita, Jachimiska Barbara: Dendrimer platforms for targeted doxorubicin delivery - physicochemical properties in context of biological responses, *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, vol. 25, nr 13, art.7201 [23 s.], DOI:10.3390/ijms25137201 2024 4,9 140 praca oryginalna

### 12.2 ROZDZIAŁY W MONOGRAFIACH NAUKOWYCH

1. Szwedowicz Urszula, Choromańska Anna: Fitoterapeutyczne działanie szałwii czerwonokorzeniowej, W: *Zastosowanie roślin w naukach medycznych i przyrodniczych*, (red.) Mariola Janiszewska, Lublin 2020, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., s. 60-70, ISBN 978-83-66489-35-6 2020 20

### 12.3 ZJAZDY KONFERENCYJNE

1. Szwedowicz Urszula, Saczko Jolanta, Choromańska Anna: Electroporation based modifications of plasma membrane organization in cancer cells for targeted therapy, W: Proceedings and workbook of the electroporation-based technologies and treatments : International Scientific Workshop and Postgraduate Course. Ljubljana, Slovenia, November 16-December 4, 2020 Peter Kramar, Damijan Miklavcic, Ljubljana 2020, Zalożba FE, s. 25, ISBN 978-961-243-410-6 2020
2. Łapińska Zofia, Szlasa Wojciech, Gajewska-Naryniecka Agnieszka, Szwedowicz Urszula, Kulbacka Julita, Choromańska Anna: In vitro study of calcium electroporation (CaEP) fused with 17 $\beta$ -estradiol in ovarian cancer treatment, W: II Interdisciplinary Conference of Doctoral Students of Medical Universities "DocUMed" under the slogan "Libertas et ipsa scientia". Łódź, October 22-24, 2021. Book of abstracts, (red.) Łukasz Duda, Łódź 2021, s. 28, ISBN 978-83-963099-5-2 2021
3. Szwedowicz Urszula, Gajewska-Naryniecka Agnieszka, Łapińska Zofia, Kulbacka Julita, Saczko Jolanta: Electroporation-based applications: extracellular vesicles, W: II Interdisciplinary Conference of Doctoral Students of Medical Universities "DocUMed" under the slogan "Libertas et ipsa scientia". Łódź, October 22-24, 2021. Book of abstracts, (red.) Łukasz Duda, Łódź 2021, s. 32, ISBN 978-83-963099-5-2 2021
4. Szwedowicz Urszula, Choromańska Anna: Potencjalne właściwości regeneracyjne kwasu salwianolowego B - badania in vitro, W: IV Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Rośliny w naukach medycznych i przyrodniczych". [Online], 28 maja 2021 r. Abstrakty, Lublin 2021, Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL, s. 54, ISBN 978-83-66861-39-8 2021
5. Szwedowicz Urszula, Łapińska Zofia, Biezuńska-Kusiak Katarzyna, Gajewska-Naryniecka Agnieszka, Kulbacka Julita, Saczko Jolanta, Chwiłkowska Agnieszka, Choromańska Anna: Wpływ elektroporacji na uwalnianie mikropecherzyków błonowych z komórek nowotworowych, W: VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 03 grudnia 2021 r. Książka abstraktów, Wrocław 2021, s. 10 2021
6. Gajewska-Naryniecka Agnieszka, Łapińska Zofia, Szwedowicz Urszula, Rudno-Rudzińska Julia, Kulbacka Julita: Biomarkers for early detection of pancreatic cancer - what is new, W: VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 03 grudnia 2021 r. Książka abstraktów, Wrocław 2021, s. 16 2021
7. Biezuńska-Kusiak Katarzyna, Gajewska-Naryniecka Agnieszka, Łapińska Zofia, Szwedowicz Urszula: Rodzaje śmierci komórkowej ze szczególnym uwzględnieniem apoptozy po zastosowaniu elektroporacji w obecności jonów wapnia w komórkach gruczolaka gruczołu sutkowego MCF-7/WT i MCF-7/DOX, W: VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 03 grudnia 2021 r. Książka abstraktów, Wrocław 2021, s. 5 2021
8. Łapińska Zofia, Szlasa Wojciech, Szewczyk Anna, Szwedowicz Urszula, Gajewska-Naryniecka Agnieszka, Biezuńska-Kusiak Katarzyna, Kulbacka Julita, Saczko Jolanta: Elektroporacja z jonami wapnia i 17 $\beta$ -estradiolem jako potencjalna metoda leczenia raka jajnika in vitro, W: VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 03 grudnia 2021 r. Książka abstraktów, Wrocław 2021, s. 9 2021
9. Łapińska Zofia, Szwedowicz Urszula, Gajewska-Naryniecka Agnieszka, Szewczyk Anna, Saczko Jolanta: Calcium electroporation (CaEP) fused with 17 $\beta$ -estradiol in ovarian cancer treatment in vitro, W: XXVIth International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society. Cluj-Napoca, Romania, 9-13 May, 2021. Abstract book, Cluj-Napoca 2021, 207 poz.S3-P-06 2021



10. Choromańska Anna, Szwedowicz Urszula, Saczko Jolanta, Kulbacka Julita: Membrane extracellular vesicles released after electroporation as mediators for melanoma-fibroblasts communication, W: 4th World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine, and Food & Environmental Technologies. Copenhagen, Denmark, 9 - 13 October 2022. Book of abstracts, (red.) Julie Gehl, Stine Frandsen Dobbelaar, Samo Mahnič-Kalamiza 2022, 149-150 poz.PO-016 2022
11. Szwedowicz Urszula, Choromańska Anna: Electroporation as an aid in obtaining extracellular vesicles from cancer cells. Increasing the efficiency of EVs isolation using differential centrifugation, W: 4th World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine, and Food & Environmental Technologies. Copenhagen, Denmark, 9 - 13 October 2022. Book of abstracts, (red.) Julie Gehl, Stine Frandsen Dobbelaar, Samo Mahnič-Kalamiza 2022, 57 poz.OR-51 2022
12. Straszewska Katarzyna, Szwedowicz Urszula, Kobielarz Magdalena, Gazińska Małgorzata, Sterczała Barbara, Chwiłkowska Agnieszka: Assessment of biocompatibility of modified poly(glycerol adipate) biomaterials with human fibroblasts in vitro, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2023, vol. 32, nr 3 spec., s. 107, [5th International Wroclaw Scientific Meetings. Wrocław, Poland, October 19-21, 2023. Abstract book] 2023
13. Szwedowicz Urszula, Choromańska Anna: Exploring the impact of electroporation-induced extracellular vesicles on melanoma cell biology, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2023, vol. 32, nr 3 spec., s. 44, [5th International Wroclaw Scientific Meetings. Wrocław, Poland, October 19-21, 2023. Abstract book] 2023
14. Biezuńska-Kusiak Katarzyna, Gajewska-Naryniecka Agnieszka, Szwedowicz Urszula, Łapińska Zofia: The influence of microplastic particles on the development of breast cancer cells, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2023, vol. 32, nr 3 spec., s. 51, [5th International Wroclaw Scientific Meetings. Wrocław, Poland, October 19-21, 2023. Abstract book] 2023
15. Choromańska Anna, Szwedowicz Urszula, Szewczyk Anna, Saczko Jolanta, Kulbacka Julita: Tumorigenic potential of electroporation-generated extracellular vesicles, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2023, vol. 32, nr 3 spec., s. 55, [5th International Wroclaw Scientific Meetings. Wrocław, Poland, October 19-21, 2023. Abstract book] 2023
16. Chwiłkowska Agnieszka, Sterczała Barbara, Szwedowicz Urszula, Kobielarz Magdalena, Dominiak Marzena: An in vitro study of the impact of APRF+ on autogenous gingival fibroblasts, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2023, vol. 32, nr 3 spec., s. 56, [5th International Wroclaw Scientific Meetings. Wrocław, Poland, October 19-21, 2023. Abstract book] 2023
17. Jachimska Barbara, Szota Magdalena, Szwedowicz Urszula, Rembiałkowska Nina, Janicka-Kłós Anna, Kulbacka Julita: Theranostic nanocarriers of doxorubicin based on dendrimer, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2023, vol. 32, nr 3 spec., s. 68, [5th International Wroclaw Scientific Meetings. Wrocław, Poland, October 19-21, 2023. Abstract book] 2023
18. Szwedowicz Urszula, Chwiłkowska Agnieszka, Choromańska Anna: Extracellular vesicles and their increased pro-cancer potential after reversible electroporation, W: FEBS 2023 - The 47th FEBS Congress "Together in bioscience for a better future". Tours, France, 8-12 July 2023. Abstracts - Abstract Finder [online] 2023, poz. LB-R-01.1-03 2023
19. Łapińska Zofia, Szwedowicz Urszula, Karska Julia: Nutraceutyki w walce z kancerogennym działaniem smogu, W: V Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Ochrona środowiska - rozwiązania i perspektywy". Lublin, 25 maja 2023 r. Abstrakty, (red.) Paulina Szymczyk, Monika Maciąg 2023, Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL, s. 22-23, ISBN 978-83-67670-24-1 2023

20. Szwedowicz Urszula, Choromańska Anna: Electroporation-induced extracellular vesicles: unveiling dynamics, impact on melanoma cells, and insights into a bystander phenomenon, W: VIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 06 grudnia 2023 roku. Książka abstraktów, Wrocław 2023, s. 18 2023
21. Szwedowicz Urszula, Choromańska Anna: The impact of electroporation-induced extracellular vesicles on melanoma cell behavior, W: XXVII Gliwice Scientific Meetings. Gliwice, November 16-17, 2023. Conference materials [online] 2023, 111 poz.[V-7] 2023
22. Biezuńska-Kusiak Katarzyna, Gajewska-Naryniecka Agnieszka, Chwiłkowska Agnieszka, Szwedowicz Urszula, Baczyńska Dagmara, Rembiałkowska Nina, Szewczyk Anna, Kulbacka Julita: Microplastic particles (MPs) delivery by electro poration (EP) and their effects on the develop ment of breast cancer cells, W: 5th World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine, and Food & Environmental Technologies. Rome, Italy, 15–19 September, 2024. Programme and book of abstracts, (red.) Caterina Merla, Francesca Apollonio, Samo Mahnič-Kalamiza 2024, ISEBTT - The International Society For Electroporation-Based Technologies and Treatments, 265-266 poz.PO-45 2024
23. Choromańska Anna, Szwedowicz Urszula, Szewczyk Anna, Baczyńska Dagmara, Kruszakin Roksana, Pawlik Krzysztof J., Kulbacka Julita: Electroporation-generated extracellular vesicles in tumor and normal cells interactions, W: 5th World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine, and Food & Environmental Technologies. Rome, Italy, 15–19 September, 2024. Programme and book of abstracts, (red.) Caterina Merla, Francesca Apollonio, Samo Mahnič-Kalamiza 2024, ISEBTT - The International Society For Electroporation-Based Technologies and Treatments, 276 poz.PO-64 2024