



Śląski
Uniwersytet
Medyczny
w Katowicach

RN-BF 4000. 7. 2020
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
BIURO RPK/23753/2024
RADY DYSCYPLINY NAUKI FARMACEUTYCZNE
Podpis 19.12.2024

marka
-śląskie

Znak: FZK-1349/24

***Ocena rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Szwedowicz
pt.: "Wpływ elektroporacji na transport dwukierunkowy, procesy
fizjologiczne oraz komunikację między komórkami nowotworowymi,
badania in vitro"***

***Promotor: dr hab.inż. Anna Choromańska, prof. Uniwersytetu
Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
oraz
dr Agnieszka Chwiłkowska***

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

Dr hab.n.med. Małgorzata
Latocha, prof. SUM

Kierownik Zakładu Biologii
Komórki
Wydział Nauk
Farmaceutycznych
w Sosnowcu
Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach

tel.: (+48 32) 364 12 10-12
fax: (+48 32) 364 12 11

Mimo licznych i od wielu lat prowadzonych badań, nowotwory dalej są dla nas pod wieloma względami dużą niewiadomą. Nieustająco poszukujemy lepszych i dokładniejszych metod diagnostycznych oraz możliwości precyzyjnego i skutecznego niszczenia zmutowanych komórek. Każdy sposób oddziaływania na nowotwór prowadzący do ograniczenia jego wzrostu budzi zawsze zainteresowanie i daje nadzieję na poskromienie plagi jaką są obecnie choroby onkologiczne. Wiele znanych już leków czy substancji naturalnych wykazuje działanie przeciwnowotworowe. Problemem jest jednak dostarczenie ich do zmutowanych komórek. Możliwości poprawy transportu przez błonowego upatruje się między innymi w elektroporacji. Elektrochemioterapia jest już obecnie z powodzeniem wykorzystywana - szczególnie w weterynarii - do niszczenia zmian w skórze, tkance podskórnej i litych guzów w przypadku trudnych i delikatnych lokalizacji. Zastosowanie na szerszą skalę wymaga dokładniejszego poznania zjawisk towarzyszących tej technice - np. wpływowi elektroporacji na struktury wewnętrzne komórek nowotworowych i prawidłowych oraz konsekwencji tych zjawisk. Podjęty przez Doktorantkę temat doskonale wpisuje w ten nurt badań.

Od dawna obserwowano wydzielanie obłonionych pęcherzyków przez niektóre rodzaje komórek, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych. W ciągu ostatnich lat pojawiło się wiele prac na temat roli pozakomórkowych mikropęcherzyków (EV). Wskazują one na udział EV w komunikacji międzykomórkowej (np. w roli nośników bioaktywnych cząsteczek białka, mRNA czy mikroRNA) - otwiera to nowe możliwości w zakresie diagnostyki i leczenia chorób. Badane są możliwości ich zastosowania jako biomarkerów, nośników dostarczających leki i samodzielnych środków terapeutycznych. Małe rozmiary EV ułatwiają ich przemieszczanie się na znaczne odległości wraz z płynami ustrojowymi, a zdolność do wiązania się z komórkami docelowymi umożliwia szeroki zakres



działania. Ten rodzaj komunikacji międzykomórkowej odgrywa zasadniczą rolę w modulacji mikrośrodowiska - w pęcherzykach, oprócz białek regulatorowych i receptorów, transportowane są również RNA i lipidy. Prowadzone są też badania roli EV w progresji choroby nowotworowej, odnoszące się do możliwości ich działania jako nośników cargo, udziału w tworzeniu ognisk wtórnych, powstawaniu lekooporności, bezpośredniego wpływu na mikrośrodowisko nowotworu czy oddziaływanie z komórkami odpornościowymi. Skład EV określa zakres informacji przenoszonych przez EV i skalę oddziaływania.

Przedłożona mi do oceny rozprawa liczy 97 stron i składa się z: Spisu treści, Wstępu, Celu i założeń pracy, Materiałów i metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków, Streszczenia (w języku polskim i angielskim), Bibliografii i Spisu rycin. Na końcu rozprawy zamieszczono wykaz osiągnięć Doktorantki, na który składają się: Wykaz publikacji w czasopismach z IF, Wykaz rozdziałów w monografiach naukowych, Wykaz konferencji.

I rozdział to 17-stronicowy „**Wstęp**” stanowiący wprowadzenie w podstawowe zagadnienia dotyczące elektroporacji i mikropęcherzyków.

W rozdziale „**Cel i założenia pracy**” Doktorantka sformułowała główny cel pracy – było to: *„Zbadanie wpływu konwencjonalnej elektroporacji na profil uwalnianych mikropęcherzyków (MVEs) u komórek nowotworowych i prawidłowych”* i wskazała 5 celów szczegółowych jakie postawiła sobie w toku prowadzonych prac: 1) *analizę wpływu elektroporacji na integralność błon komórkowych i transport dwukierunkowy u komórek linii A375, Me45 i HaCaT*, 2) *weryfikację skuteczności wirowania sekwencyjnego jako metody izolacji mikropęcherzyków oraz potwierdzenie obecności MVEs (ektosomy, mikropęcherzyki o wielkości 100 – 1000nm) w supernatancie elektroporowanych komórek*, 3) *ocenę ilościową i jakościową mikropęcherzyków pozyskanych od komórek poddanych elektroporacji z użyciem pola elektrycznego o natężeniu 800, 1200 oraz 1600 V/cm*, 4) *zbadanie wpływu wyizolowanych MVEs na zdolności proliferacyjne i migracyjne innych komórek czerniaka i keratynocytów*, 5) *analizę zmian ekspresji wybranych białek powierzchniowych i aktywności enzymów biorących udział w procesach adhezji i migracji komórkowej pod wpływem badanych MVEs*. Wyodrębnione cele szczegółowe w pełni odnoszą się do tematu pracy zawartego w tytule rozprawy. Autorka w tym rozdziale wskazała też na możliwe korzyści z prowadzonych badań: 1) opracowanie w ramach prowadzonych badań, metod umożliwiających izolację charakterystykę mikropęcherzyków pozakomórkowych (MVEs) oraz 2) wkład w rozwój skuteczniejszych i bezpieczniejszych dla pacjenta metod leczenia nowotworów. Pozytywnie oceniam projekt planu przebiegu całego projektu badawczego – wydaje się przemyślany i prowadzący do realizacji głównego celu pracy.

„**Materiały i metody**”. Badania prowadzono na 3 liniach komórkowych: dwóch liniach czerniaka ludzkiego A375 z ATCC i Me45 z Pracowni Radiobiologii Narodowego Instytutu Onkologii w Gliwicach oraz komórkach keratynocytów – linia HaCaT z ATCC.

Do elektroporacji wykorzystano elektroporator BTX ECM 830 (BTX Harvard Apparatus, Syngen Biotech) z odpowiednim oprzyrządowaniem.

Wszystkie planowane prace i zadania zostały zwięźle opisane. Brakuje mi jednak np. w rozdziale 4.2.1 jasno i precyzyjnie określonych zastosowanych w pracy warunków elektroporacji (jest tylko informacja, że *[...]zostały dobrane na podstawie danych literaturowych i standardowych procedur ESOPe[...]*).

Do oceny żywotności komórek zastosowano test na bazie resazuryny, a wydajność elektroporacji komórek eksponowanych wcześniej na kalceinę oceniano za pomocą systemu Incucyte do obrazowania żywych komórek w czasie rzeczywistym z automatycznym pomiarem intensywności fluorescencji oraz

cytometrii przepływowej z wykorzystaniem Cy-Fow CUBE-6 (Sysmex). MVEs były izolowane metodą sekwencyjnego wirowania. Do ich identyfikacji Doktorantka zastosowała oznaczania CD63 (test ELISA), obrazowanie przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEM-F200 (Jeol) i programu ImageJ do pomiarów wielkości MVEs. Wykorzystując oprogramowanie CytExpert wersja 2.6 (Beckman Coulter) Doktorantka przeprowadziła analizę rozkładu wielkości MVEs i analizę ilościową MVEs. Do oceny rozkładu wielkości MVEs wyizolowanych z kondycjonowanej pożywki komórek zastosowała technikę dynamicznego rozpraszania światła laserowego (DLS).

W ramach oceny wpływu MVEs na komórki Doktorantka wykonała test PrestoBlue™ (test żywotności i proliferacji komórek), test zarastania rany (migracja i proliferacja komórek), analizę impedancji przy użyciu systemu RTCA-iCELLigence (ACEA Biosciences, Inc.), oznaczanie całkowitej kinazy adhezji ogniskowej (FAK) za pomocą testu ELISA (FAK Total ELISA Kit, ThermoFisher Scientific), oraz oznaczanie E-kadheryny (CD324) i N-kadheryny (CD325) metodą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem przeciwciał sprzężonych z fluorochromami (przeciwciała przeciwko CD324 i CD325, BioLegend) i cytometru BD FACSCanto, Becton Dickinson. Analizę statystyczną uzyskanych wyników Autorka przeprowadziła z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji (test ANOVA) i testu Dunetta.

Uwaga: w przypadku testu zarastania rany określenie [..], „obszar rany” [..] w odniesieniu do szerokości rysy wykonanej w dołku naczynia hodowlanego nie jest zbyt fortunny.

Uzyskane wyniki Doktorantka przedstawiła na 29 stronach rozdziału „Wyniki” ilustrując je 22 rycinami z odpowiednimi opisami i analizami.

W 8 stronicowym rozdziale „Dyskusja” Doktorantka omówiła wyniki na tle informacji literaturowych odnoszących się do zagadnień prezentowanych w pracy.

W kolejnym rozdziale „Wnioski” pracy sformułowała 5 wniosków końcowych stwierdzając, że:

-przy wybranych parametrach pracy możliwa jest do uzyskania elektroporacja odwracalna wybranych komórek nowotworowych i prawidłowych (indukowane tymczasowe zmiany w przepuszczalności błon bez trwałego uszkodzenia komórek)

-zastosowane wirowanie sekwencyjne jest skuteczną i efektywną metodą pozyskiwania funkcjonalnych mikropęcherzyków (MVEs) o pożądanej wielkości

-elektroporacja odwracalna komórek powoduje zwiększone uwalnianie MVEs, przy czym zastosowane impulsy elektryczne nie mają istotnego wpływu na morfologię i średnicę MVEs

-MVEs pochodzące z komórek poddanych elektroporacji wykazują działanie hamujące migrację, adhezję i ograniczające przeżywalność innych komórek (efekt świadka, *Bystander effect*)

- MVEs pochodzące z komórek poddanych elektroporacji wpływają na ekspresję kadheryn poziom kinazy ogniskowo-adhezyjnej FAK oraz ekspresję białka CD63, a uzyskiwane efekty zależą od natężenia pola elektrycznego i wrażliwości komórek (od linii komórkowej).

Uwaga: w tym rozdziale brakuje mi jeszcze wniosku odnoszącego się do ewentualnych różnic/lub ich braku w zachowaniu się między komórkami prawidłowymi i nowotworami.

Doktorantka w pracy powołała się na 120 tekstów źródłowych („Bibliografia”) związanych tematycznie z zagadnieniami opracowanymi w rozprawie. Piśmiennictwo zostało prawidłowo dobrane, jest aktualne i z nielicznymi wyjątkami posiada jednolity format. Cytowania zostały umieszczone we właściwych miejscach w tekście.

Ocenianą rozprawę doktorską uważam za bardzo wartościową pracę naukową opartą o innowacyjny, przemyślany i starannie zrealizowany projekt naukowy. W pracy pojawia się jednak sporo niedociągnięć o charakterze edytorskim (np. w tekście wielokrotnie zdanie zaczyna się z małej litery, w tekście pojawia się też pusta strona -str. 54 itp.) oraz nieprecyzyjności lub „niezręczności” określeń np.:

str. 8: [...]główną przeciwnością terapii jest anatomia[...] (?), str. 22: [...], „leczonych” elektroporacją komórek [...] (?), str. 27: [...]aktywność enzymatyczna procesów[...] (?), str. 34: [...]nasadzano komórki[...]. Brak jest też spisu stosowanych skrótów, co zawsze ułatwia czytelnikowi odbiór tekstu. To wszystko drobne rzeczy, ale zwracające uwagę czytelnika, więc warto je jeszcze sprawdzić i skorygować przed drukiem. Pod względem merytorycznym praca jest jednak bardzo wartościowa i wykorzystuje zaawansowany warsztat badawczy, a Doktorantka sprawnie interpretuje uzyskane wyniki.

Stwierdzam, że: rozprawa doktorska mgr Urszuli Szwedowicz pt.:” Wpływ elektroporacji na transport dwukierunkowy, procesy fizjologiczne oraz komunikację między komórkami nowotworowymi, badania in vitro” spełnia warunki określone w art. 187 ust.1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (DZ.U. z 2018 r., poz.1668 ze zm.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie rozprawy mgr Urszuli Szwedowicz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.



Dr hab.n.med.Małgorzata Latocha, prof. ŚUM
Kierownik Zakładu Biologii Komórki
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach