



Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

FZK-1184/21



Sosnowiec / 21-05-2021 r.

Zakład Biologii Komórki
Wydział Nauk
Farmaceutycznych
w Sosnowcu
Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach

41-200, Sosnowiec

ul. Jedności 8

www.sum.edu.pl

Kierownik zakładu
dr hab.n.med. Małgorzata Latocha

tel.: (+48 32) 364 12 10-14
fax: (+48 32) 364 12 11

SEKRETARIAT

tel.: (+48 32) 364 12 10

fax: (+48 32) 364 12 11



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

**Ocena rozprawy doktorskiej
mgr Katarzyny Biezuńskiej-Kusiak
"Ocena przeciwnowotworowego działania jonów wapnia wprowadzanych do
ludzkich komórek nowotworowych MCF-7/WT i MCF-7/DOX metodą
elektroporacji"**

Promotor pracy: Dr hab.inż. Anna Choromańska
Promotor pomocniczy: Dr hab. inż. Julita Kulbacka, prof. uniw.

Nowotwory to ciągle ogromny problem i wyzwanie dla ludzkości. Mimo wysiłków naukowców i lekarzy z całego świata, wielkich nakładów finansowych, coraz większej świadomości w zakresie ochrony zdrowia, ciągle zmagamy się z rosnącą liczbą chorych. Wydłużający się czas życia, ciągły stres, zanieczyszczenie środowiska, kontakt z różnego rodzaju ksenobiotykami, to jedne z wielu czynników sprzyjających rozwojowi choroby nowotworowej. Liczne badania i programy prowadzone na całym świecie, których celem jest poznanie procesu nowotworowego, warunków jego inicjacji – podłoża molekularnego samego zjawiska, predyspozycji poszczególnych osób do rozwoju takich chorób, mechanizmów działania substancji kancero- i mutagennych, możliwości przeciwdziałania inicjacji i rozwojowi choroby oraz - co najważniejsze - leczenia różnych nowotworów, pozwalają na osiągnięcie pewnych sukcesów w walce z tą chorobą, ale i tak są ciągle niewystarczające. Poszukiwane są bez ustanku skuteczniejsze i jak najmniej obciążające organizm pacjenta metody terapeutyczne. Rozpatrywane są tu zarówno metody „uniwersalne” (możliwe do zastosowania w walce z wieloma różnymi nowotworami), jak i metody „dedykowane” określonym nowotworom i pacjentom o określonym profilu genetycznym – „terapia celowana”. Każda z metod, której efektem jest eliminacja patologicznych komórek z organizmu przy utrzymaniu podstawowych funkcji życiowych pacjenta, jest bardzo cenna. Oczywiście czym metoda prostsza, tańsza i mniej wyniszczająca, tym lepiej – a i szansa na wprowadzenie do leczenia na szeroką skalę większa.

Temat podjęty przez Doktorantkę - dotyczący oddziaływania jonów wapnia na komórki nowotworowe gruczolakoraka gruczołu sutkowego wrażliwego oraz opornego na działanie doksorubicyny (linie MCF-7 WT oraz MCF-7/DOX) w połączeniu z elektroporacją, w świetle informacji literaturowych oraz w aspekcie ciągłych poszukiwań lepszych i skuteczniejszych metod walki z nowotworami, jest bardzo

interesujący, aktualny i potrzebny. Autorka przekonuje do tego i udowadnia swoje racje we wstępie teoretycznym do pracy. Jasne i klarowne wprowadzenie w zagadnienia, którymi zamierza się zająć Doktorantka w swojej pracy – to już do samego początku duży atut rozprawy, który świadczy o znajomości tematu oraz jasno sprecyzowanych zainteresowaniach i zdecydowaniu Autorki odnośnie planowanych badań. W rozdziale tym znajdują się najważniejsze informacje dotyczące nowotworów gruczołu sutkowego (podstawowe dane statystyczne, opis czynników ryzyka, typy raka piersi, objawy i profilaktyka, klasyfikacja TNM nowotworów gruczołu sutkowego, obecnie stosowane metody leczenia nowotworu gruczołu sutkowego), informacje dotyczące zjawiska oporności wielolekowej, oraz rozdział dotyczący znaczenia jonów wapnia dla funkcjonowania komórek. Doktorantka zamieściła tu też charakterystykę i opis działania kanałów wapniowych oraz możliwy mechanizm udziału jonów wapnia w aktywacji śmierci komórkowej. Tą część rozprawy zamyka podrozdział dotyczący elektroporacji (EP) - metody zastosowanej w pracy do wprowadzania jonów wapnia do komórek. Znalazły się tu: opis samej metody - definicje i krótki rys historyczny, mechanizm działania, informacje na temat zastosowania EP w biologii i medycynie, podrozdział dotyczący elektrochemioterapii (ECT) oraz elektroporacji z jonami wapnia (CaEP) i zastosowaniu CaEP w terapii nowotworów gruczołu sutkowego. Wszystko przedstawione w przemyślany, usystematyzowany i klarowny sposób w oparciu o literaturę (211 pozycji literaturowych).

Po takim wprowadzeniu cel pracy jaki postawiła sobie Doktorantka – ...[„Ocena przeciwnowotworowej aktywności elektroporacji w połączeniu z jonami wapnia w stosunku do ludzkiej linii komórkowej gruczolakoraka gruczołu sutkowego wrażliwej MCF-7-WT oraz odpornej na działanie dokсорubicyny MCF-7/DOX”].... – staje się w pełni uzasadniony. Doktorantka założyła też, że dzięki zaplanowanym badaniom uda jej się, nie tylko poszerzyć wiedzę na temat mechanizmów indukowanych w komórkach nowotworowych gruczolakoraka gruczołu sutkowego na skutek CaEP, ale również opracować protokół elektroporacji pozwalający uzyskać większą efektywność przeciwnowotworowego działania egzogennych jonów wapnia, dostarczanych do komórki poprzez elektroporację, w porównaniu do prób traktowanych samą EP lub jonami wapnia bez EP. Spodziewanym rezultatem projektu było takie dopracowanie parametrów metody, które pozwolą na indukowanie śmierci badanych komórek, co z kolei będzie podstawą do zaplanowania kolejnych etapów badań na poziomie *in vivo*.

Planowane do wykorzystania w pracy metody: 1) spektrofotometryczna do oceny przeżywalności (liczby i aktywności metabolicznej) komórek z wykorzystaniem testów MTT, SRB, ATP-lite, 2) metoda cytometrii przepływowej do oceny efektywności permeabilizacji błon komórkowych oraz rodzaju śmierci komórek, 3) immunocytochemiczna ocena białek A-1G i A-1H, 4) metoda TUNEL - do analizy rodzaju śmierci komórek, 5) użycie mikroskopu holotomograficznego do oceny morfologii komórek - wszystkie te metody zostały dobrane adekwatnie do zaplanowanych zadań i tego jakie Doktorantka chciała uzyskać informacje z planowanego doświadczenia. Duży plus

na konto Doktorantki za jasny, przejrzysty, zwięzły – ale ze wszystkimi istotnymi szczegółami – opis metodyki

Wyniki badań Doktorantka przedstawiła na 39 stronach opracowania w postaci: 31 rycin, 4 tabel i 14 fotografii - zamieszczając przy tym odpowiednie opisy i komentarze. Uzyskane wyniki Doktorantka omówiła na tle wybranych danych literaturowych w kolejnym - 9- stronicowym rozdziale „Dyskusja”.

Z uwag jakie nasunęły mi się podczas lektury pracy to np. to, że w dokumentacji zdjęciowej - gdzie na jedną rycinę z podpisem o konkretnym numerze fotografii składa się kilka lub kilkanaście zdjęć – niektóre są w innym powiększeniu niż pozostałe. W podpisie fotografii nie ma takiej informacji, a zamieszczone w rogach poszczególnych zdjęć opisy są niestety tak małe, że nie udało mi się ich odczytać.

Podsumowanie uzyskanych wyników Doktorantka zebrała w postaci 6 wniosków końcowych:

...[1. Zastosowanie elektroporacji w połączeniu w jonami wapnia (CaEP) powoduje znaczny spadek przeżywalności komórek badanych linii gruczolakoraka gruczołu sutkowego (MCF-7/WT i MCF-7/DOX), w porównaniu z działaniem samej elektroporacji lub jonów wapnia jako pojedynczej metody terapeutycznej.

2. Zastosowanie zarówno EP, jak i CaEP powoduje znaczny spadek wewnątrzkomórkowego ATP w obu badanych liniach komórkowych.

3. Śmierć komórkowa po zastosowaniu elektroporacji w obecności jonów wapnia dla komórek linii MCF-7/WT zachodzi na drodze późnej apoptozy i nekrozy, zaś najwięcej komórek linii MCF-7/DOX znajduje się we wczesnej apoptozie.

4. Zastosowanie elektroporacji oraz elektroporacji z jonami wapnia powoduje wzrost ekspresji podjednostek białkowych kanałów typu T (α -1H i α -1G) z podobną intensywnością w obu badanych liniach komórkowych.

5. Komórki linii MCF-7/DOX są bardziej wrażliwe na zastosowaną metodę terapeutyczną (EP oraz CaEP).

6. Najefektywniejsze działanie przeciwnowotworowe wykazała elektroporacja z jonami wapnia w porównaniu do samej elektroporacji. Jony wapnia nie wywołały większego efektu terapeutycznego]...

Do tak sformułowanych wniosków mam jednak kilka uwag:

Odnosnie wniosku 3 (...[” Śmierć komórkowa po zastosowaniu elektroporacji w obecności jonów wapnia dla komórek linii MCF-7/WT zachodzi na drodze późnej apoptozy i nekrozy, zaś najwięcej komórek linii MCF-7/DOX znajduje się we wczesnej apoptozie”].....) – po pierwsze - śmierć komórkowa - jeśli rozpatrujemy tu tylko te dwa rodzaje śmierci – zawsze zachodzi na zachodzi na drodze późnej apoptozy lub nekrozy – nie ma tu żadnego odkrycia; jednak dalsza część wniosku sugeruje raczej, że Doktorantka chciała chyba zwrócić uwagę na to, że po określonym czasie (jakim?) w hodowlach MCF-7/WT komórki umierają (są już na etapie późnej apoptozy lub uległy nekrozie), a w tym samym czasie w hodowlach komórek linii MCF-7/DOX zjawiska te nie są jeszcze tak zaawansowane i najwięcej komórek znajduje się we wczesnym etapie apoptozie.

Odnosnie wniosku 4 (...["*Zastosowanie elektroporacji oraz elektroporacji z jonami wapnia powoduje wzrost ekspresji podjednostek białkowych kanałów typu T (α -1H i α -1G) z podobną intensywnością w obu badanych liniach komórkowych*"]) – brakuje mi tu trochę jakiejś bardzo krótkiej informacji odnośnie znaczenia tego wyniku —szczególnie w kontekście kolejnego wniosku ... [Komórki linii *MCF-7/DOX są bardziej wrażliwe na zastosowaną metodę terapeutyczną (EP oraz CaEP)*]....

Odnosnie wniosku 6 – wniosek ten ...[*Najefektywniejsze działanie przeciwnowotworowe wykazała elektroporacja z jonami wapnia w porównaniu do samej elektroporacji. Jony wapnia nie wywołały większego efektu terapeutycznego*]... jest w zasadzie powtórzeniem wniosku pierwszego, ale w bardziej ogólnej formie i stanowi raczej podsumowanie końcowe. A jeżeli już został sformułowany to doprecyzowałabym informację[*„Jony wapnia nie wywołały większego efektu terapeutycznego”*]....- że chodzi tu o jony wapnia podane w celach terapeutycznych (a nie tylko o jony wapnia znajdujące naturalnie w bezpośrednim środowisku komórki).

W związku z tym, Autorka jako cel pracy wskazała możliwość opracowania protokołu elektroporacji pozwalającej uzyskać większą efektywność przeciwnowotworowego działania egzogennych jonów wapnia, brakuje mi trochę we „Wnioskach” informacji, czy taki protokół opracowano i jakie parametry charakteryzują największą skuteczność metody. Oczywiście wszystkie te informacje zawarte są w rozdziale „Wyniki” i „Dyskusja”, ale w świetle oczekiwań jakie zawarła Autorka w rozdziale „Cel i założenia pracy” mogłyby też zostać uwzględnione we „Wnioskach”.

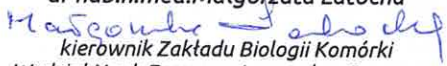
Chciałabym się też odnieść do bibliografii – jak już wcześniej wspominałam 211 tekstów źródłowych zgodnych z tematyką pracy, przede wszystkim opublikowanych w ostatnich 10-u latach (choć są tu też pozycje z lat 70-tych i 80-tych ubiegłego wieku, czy nawet z 1958 r.). Przy niektórych pozycjach pojawiły się jakieś braki (np. brak roku publikacji) i nie we wszystkich przypadkach sposób cytowania jest taki sam (warto na to zwrócić uwagę przed ewentualną publikacją w wybranym czasopiśmie i ujednoczyć to).

Praca bardzo mi się podoba. Ma duże walory aplikacyjne - temat podjęty przed Doktorantką jest bardzo istotny i „przyszłościowy”. Sama rozprawa doktorska jest napisana prosto i przejrzysto – co jest dużą umiejętnością i zwykle cechuje osoby o dobrze ugruntowanej wiedzy na dany temat i bardzo dobrze orientujące się w zagadnieniach, którymi się zajmują. Elektrochemioterapia - metoda, którą zastosowała w swoich badaniach Doktorantka – to w założeniach metoda prosta, ale i z wielkim potencjałem, jednak równocześnie jeszcze nie do końca poznana i w związku z tym niedoceniona. Otwiera ogromne możliwości w zakresie modyfikowania losów komórki. W Polsce to właśnie Wrocław jest ośrodkiem, który prowadzi najwięcej badań dotyczących elektrochemioterapii i jest pionierem jeśli chodzi o jej praktyczne zastosowanie do terapii nowotworów.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji praca zasługuje na:

- 1) wysoką ocenę merytoryczną – zarówno w aspekcie trafności podjętej problematyki badawczej i oryginalności, uzyskanych rezultatów i ich znaczenia dla nauki i praktyki, jak i poprawności formalno-językowej samej rozprawy
- 2) wysoką ocenę w zakresie metodologii (dobór literatury, umiejętności wykorzystania źródeł, poprawność formułowania problemów i hipotez, trafności doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętności ich zastosowania, poprawności układu i struktury pracy).

Stwierdzam też, że przedłożona mi do oceny **rozprawa doktorska mgr Katarzyny Biezuńskiej-Kusiak pt.: "Ocena przeciwnowotworowego działania jonów wapnia wprowadzanych do ludzkich komórek nowotworowych MCF-7/WT i MCF-7/DOX metodą elektroporacji"** spełnia wszystkie wymagania określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr 65, poz. 595, z póź.zm.) stawiane rozprawom doktorskim. Mam przyjemność wnioskować do Rady Dyscypliny Nauki Medycznej, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Katarzyny Biezuńskiej-Kusiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab.n.med. Małgorzata Latocha

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