

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

Uwagi ogólne na temat problematyki podjętej w rozprawie

Obecnie stale rośnie zapadalność na choroby nowotworowe, czemu sprzyja m.in. wydłużenie czasu życia oraz zwiększona ekspozycja na czynniki kancerogenne. Jednym z najczęściej występujących nowotworów jest rak piersi, wywodzący się z komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego. Wykazano, że kanały wapniowe typu T (ang. *transient*, przejściowe; otwierające się krótko i aktywowane niskim potencjałem) stanowią atrakcyjny cel molekularny dla terapii przeciwnowotworowych, oferując nowe kierunki strategii terapeutycznych wykorzystujących blokery tych kanałów. Co więcej, kanały wapniowe typu T w komórkach nowotworowych często funkcjonują w sposób zaburzony, wspierając ich proliferację i lekooporność.

Doktorantka podjęła się próby integracji elektroporacji (EP, ang. *electroporation*) z jonami wapnia w kontekście terapii antynowotworowej oraz określenia efektywności tej terapii na modelu *in vitro* gruczolakoraka gruczołu sutkowego, co doskonale wpisuje się w ten niezmiernie ważny nurt badań naukowych. Stąd też zasadność podjęcia się tego zagadnienia. Warto nadmienić, że tematyka problematyki podjętej w rozprawie doktorskiej mgr Katarzyny Biezuńskiej-Kusiak stała się również podstawą publikacji, której ostatnim autorem jest promotor pomocniczy w tym przewodzie doktorskim - dr hab. inż. Julita Kulbacka (Novickij V, Rembalkowska N, Staigvila G, Kulbacka J. Effects of extracellular medium conductivity on cell response in the context of sub-microsecond range calcium electroporation *Sci Rep.* 2020;10(1):3718)). Warto byłoby odnieść się w Dyskusji rozprawy do tej publikacji, tym bardziej że prezentuje ona wyniki badań eksperymentów prowadzonych na jednej z linii komórkowych używanych przez Doktorantkę.

Celem rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Biezuńskiej-Kusiak była 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 doksorubicyny (MCF-7/DOX). Elektroporacja jest fascynującym procesem, w którym pod wpływem impulsów pola elektrycznego zwiększa się w sposób odwracalny lub nieodwracalny przepuszczalność błony komórkowej. Zastosowania

elektroporacji mają jednak ograniczenia, do których należy zaliczyć zmiany temperatury spowodowane przez ciepło Joule'a związane z przepływem prądu przez roztwór, niejednorodność pola elektrycznego w czasie i przestrzeni, zmiany pH w otoczeniu elektrod, czy powstawanie na elektrodach związków toksycznych dla komórek. Wszystkie te efekty warunkują silny spadek przeżywalności komórek wraz ze wzrostem efektywności elektroporacji.

Wcześniejsze badania przeprowadzone m.in. przez Panią Promotor - dr n. med. inż. Annę Choromańską, na liniach komórkowych gruczolaka jelita grubego oraz żołądka wykazały, że zastosowanie elektroporacji celem dostarczenia do komórek doksorubicyny powoduje znacznie silniejsze zmiany w ultrastrukturze komórek linii opornych na doksorubicynę, w porównaniu do komórek wrażliwych na ten cytostatyk.

Założeniem badań Doktorantki było uzyskanie większej efektywności przeciwnowotworowej działania egzogennych jonów wapnia, dostarczanych do komórki poprzez elektroporację, w porównaniu do prób traktowanych samą elektroporacją lub jonami wapnia bez elektroporacji. Rozprawa została przygotowana z zastosowaniem standardowych metod, umożliwiając uzyskanie wiążących wyników.

Techniczna i edytorska ocena oraz uwagi do układu rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa na stopień doktora Pani mgr Katarzyny Biezuńskiej-Kusiak pt. „Ocena przeciwnowotworowego działania jonów wapnia wprowadzanych do ludzkich komórek nowotworowych MCF-7/WT i MCF-7/DOX metodą elektroporacji” wykonana pod kierunkiem promotora, dr hab. inż. Anny Choromańskiej i promotora pomocniczego dr hab. inż. Julity Kulbackiej ma klasyczny układ. Ogółem, praca w formie typowego jednostronnego wydruku, obejmuje łącznie 127 stron wraz z wykazem dorobku naukowego. Tytuł rozprawy precyzyjnie określa zakres pracy.

Dobrze napisana rozprawa doktorska mgr Katarzyny Biezuńskiej-Kusiak składa się z kompetentnie napisanego Wstępu, Celu i założeń pracy, Materiałów i metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków, Streszczenia, Bibliografii obejmującej 211 cytowań oraz Suplementów, które stanowią Wykazy rysunków, fotografii i tabel. Obszerny Wstęp wprowadza Czytelnika w zagadnienia dotyczące nowotworu gruczołu sutkowego, oporności wielolekowej, kanałów wapniowych i elektroporacji. Podjęte badania mają przyczynić się do rozwoju bezpieczniejszych i skuteczniejszych metod leczenia nowotworów piersi. Autorka proponuje, aby w związku z niskim kosztem roztworów wapnia, a także ich dużą dostępnością w większości szpitali, badana metoda terapeutyczna została wdrożona jako standard leczenia.

Użyty warsztat metodyczny przez Doktorantkę był, w moim przekonaniu, optymalny dla realizacji celu pracy, nowoczesny i odpowiadający współczesnym standardom badań w tej dziedzinie. Za bardzo dobry pomysł uznać należy zastosowanie metody Tunel oraz cytometrii przepływowej w celu analizy rodzaju śmierci komórki. Należy podkreślić, że mgr Katarzyny Biezuńskiej-Kusiak wybrała dobrze zwalidowane metody biochemiczne do oceny przeżywalności komórek – test MTT oraz test sulforodaminy

B. Natomiast dziwi mnie oddzielne omawianie wpływu elektroporacji na przeżywalność komórek oznaczaną dwiema metodami. Bardziej zasadne byłoby łączne przedstawienie wyników uzyskanych obiema metodami; przecież chodziło o ten sam schemat doświadczeń (czy może nawet te same doświadczenia).

Mankamentem pracy jest brak uwzględnienia kontrolnych, prawidłowych linii komórkowych, jeśli badania opisane w rozprawie mają stanowić podbudowę dla terapeutycznych zastosowań elektroporacji w obecności podwyższonych stężeń Ca^{2+} , tym bardziej, że Doktorantka cytuje wyniki badań innych autorów wskazujące na wyższą podatność komórek nowotworowych w porównaniu z prawidłowymi, na tę procedurę. Brakuje mi też odniesienia w pracy do faktu, że prawidłowe stężenie wapnia całkowitego w surowicy krwi u osoby dorosłej powinno mieścić się w granicach 2.15-2.5 mmol/l, wapnia zjonizowanego 1.15-1.32 mmol/l, więc jedynie najwyższe stężenie Ca^{2+} stosowane w doświadczeniach (5 mM) oznacza wzbogacenie środowiska pozakomórkowego w te jony, w stosunku do warunków fizjologicznych.

Doktorantka interpretuje obniżenie ilości ATP w komórkach jako zwiększenie konsumpcji ATP przez komórkę. Jest to dość arbitralna interpretacja. Po pierwsze, jak wykazują oznaczenia wykonane z użyciem innych metod, część komórek jest martwa w warunkach oznaczenia. Jeśli umierają drogą nekrozy, ich zawartość uwalnia się na zewnątrz i ATP ulega rozkładowi przez fosfatazy obecne w środowisku. Należałoby ten aspekt wziąć pod uwagę oceniając ilość ATP w żywych komórkach. Po drugie, opis zasady tej metody (s. 62) jest bardzo nieprecyzyjny. Metoda nie polega na „*oznaczeniu ilości zużytego ATP przez komórkę*”. Zużytego ATP nie można oznaczać, gdyż już nie istnieje, w tej metodzie oznacza się ilość ATP aktualnie obecnego w komórkach. Nieprawdą jest, że ta metoda „*wykorzystuje zależność ATP od emisji świetlnej lucyferazy*”. ATP (? – może ilość ATP?) nie zależy od emisji światła – jest dokładnie odwrotnie. Poza tym światło jest emitowane przez utleniany substrat (lucyferinę), a nie przez enzym katalizujący tę reakcję. Pomiar ATP opiera się głównie na podstawowej reakcji lucyferazy, angażującej tę wysokoenergetyczną cząsteczkę. Należy też zwrócić uwagę, że ilość ATP w komórce zmienia się dynamicznie i jest wypadkową tempa syntezy ATP i tempa zużycia ATP. Jakkolwiek zmiany obserwowane po elektroporacji są zapewne spowodowane głównie zwiększeniem szybkości zużycia ATP, założenie, że zmierzona ilość ATP jest miarą jego zużycia jest założeniem arbitralnym jeśli nie wiemy, czy nie zmienia się szybkość syntezy ATP.

Mam kilka drobnych uwag dotyczących kolejnych części rozprawy, głównie pod adresem jej edycji:

(i) s. 12: Ryc. 1.1. Brak opisu osi;

(ii) s. 12: Co to jest „*pożywanie alkoholu*”?

(iii) s. 13: brak wyjaśnienia ER/PgR-dodatni;

(iv) s. 21: BCRP to białko oporności lekowej występujące w raku piersi, a nie białko oporności na raka piersi;

(v) s. 23: Ilości jonów wapnia „*rzędu mikromoli*” nie są niewielkie w skali komórki; to byłyby ilości wręcz monstrualne, gdyż obecność mikromola wapnia w komórce o objętości 1000 fl oznaczałaby stężenie wręcz niemożliwe do osiągnięcia (10^6 mol/litr). Autorka pracy zapewne myli ilości mikromolarne ze stężeniami mikromolarnymi;

(vi) s. 28: Autorka pracy pisze o regulacji dystrybucji fosfatydyloseryny w błonie plazmatycznej przez skramblazę. Jednak, ponieważ skramblaza jedynie likwiduje asymetrię rozkładu fosfatydyloseryny, dla pełnego obrazu należałoby wspomnieć przede wszystkim o flipazie, odpowiedzialnej za utrzymywanie asymetrycznej dystrybucji fosfatydyloseryny w błonie. Aktywność flipazy jest hamowana przez jony Ca^{2+} (np. Vallabhapurapu i wsp., *Oncotarget* 2015, 6, 34375), co może mieć znaczenie dla rozpatrywanych zjawisk;

(vii) s. 30: Wymieniając rodzaje śmierci komórkowej Autorka rozprawy miała zapewne na myśli *anoikis* (rodzaj apoptozy, indukowanej śmierci komórki); anoksja to zupełnie inne pojęcie;

(viii) s. 44: Hz jest właściwą jednostką częstotliwości, ale sekunda nie;

(ix) s. 47: Wzór podany dla obliczenia ilości zużytego ATP nie ma sensu, gdyż:

1) zmienna nie może być definiowana jako kombinacja stałych,

2) $x = (\ln x)^e$ jest tożsamością spełnioną dla każdego x ,

3) argumentem funkcji log są liczby dodatnie, więc $\log(-8,8506)$ nie istnieje.

(x) s. 48: Co to jest „dejonizowany bufor fosforanowy”? Jeżeli usunąć w ogóle jony z buforu, przestanie on być buforem, a stanie się wodą dejonizowaną. Czyżby Autorka miała na myśli bufor fosforanowy sporządzony na wodzie dejonizowanej? Bufor DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) może co najwyżej nie zawierać jonów wapnia (Ca^{2+}) i magnezu (Mg^{2+});

(xi) s. 49: Należałoby wyjaśnić skrót „HRP”;

(xii) s. 51 i nast.: termin „*efekt terapeutyczny*” nie jest odpowiedni w odniesieniu do komórek hodowanych *in vitro*;

(xiii) s. 52: Autorka pracy stwierdza: „Inkubacja komórek w roztworach chlorku wapnia [...] nie spowodowała żadnego znaczącego spadku liczby żywych komórek”. Stwierdzenie to jest ogólnie słuszne, jednak przy stężeniu 0,5 mM Ca^{2+} obniżenie przeżywalności komórek było statystycznie istotne, co winno być wzmiankowane;

(xiv) s. 52: Autorka rozprawy konstatuje: „*zastosowanie impulsów elektrycznych spowodowało spadek przeżywalności wprost proporcjonalnie do wzrostu parametrów natężenia pola elektrycznego*”. Termin „*wprost proporcjonalny*” ma ścisłą definicję matematyczną. Wykres w formie histogramu mocno utrudnia określenie zależności wprost proporcjonalnej między badanymi wielkościami, ale niezależnie od sposobu przedstawienia, przy zależności wprost proporcjonalnej jeśli pole o natężeniu 1000 V/cm powodowało spadek przeżywalności o 22%, to pole o natężeniu 1400 V powinno powodować spadek przeżywalności o $1,4 \times 22\% = 30,8\%$ (a nie 42%), zaś pole o natężeniu 800 V – spadek przeżywalności o $0,8 \times 22\% = 17,6\%$, a nie wzrost przeżywalności o 1%. Spadek przeżywalności obserwowany przez Doktorantkę był zależny od natężenia pola, ale nie był wprost proporcjonalny do natężenia pola. Ten sam błąd powtarza się przy omawianiu kolejnych wyników;

(xv) s. 54: Doktorantka konkluduje, że komórki linii MCF-7/DOX są bardziej wrażliwe na działanie CaEP niż komórki linii MCF-7/WT, szczególnie przy elektroporacji przez pole elektryczne o najwyższym stosowanym natężeniu (1400 V/cm). Istotnie, do takiego wniosku może skłaniać porównanie Ryc. 4.4 i 4.6 (przeżywalność po 48 godzinach), choć niekoniecznie Ryc. 4.3 i 4.5. Wniosek ten nie jest jednak podbudowany odpowiednią analizą statystyczną (porównaniem wyników dla komórek obu linii). Ta sama uwaga nasuwa się przy omówieniu kolejnych wyników:

(xvi) s. 60: Analogiczna uwaga nasuwa się przy porównaniu przeżywalności testem MTT oraz kiedy porównywana jest zawartość ATP w komórkach (s. 67);

(xvii) s. 56: 800 V/cm itd. to nie są, jak pisze Doktorantka, „parametry”, ale wartości natężenia pola elektrycznego;

(xviii) s. 70,71: Dane przedstawione na Ryc. 4.19 i 4.20 są niezrozumiałe bez komentarza. Dlaczego komórki wybarwione małącząsteczkowym barwnikiem YO-PRO-1 wykazują wyższą fluorescencję po elektroporacji (szczególnie komórki poddane działaniu pola o natężeniu 1400 V/cm)? Szkoda, że w pracy nie podano ilościowo parametrów rozkładu fluorescencji;

(xix) s. 91 i in.: Można się zastanawiać, jak powinny być interpretowane wyniki oznaczeń żywotności komórek z MTT. Czy odpowiedź komórek jest zero-jedynkowa (komórka albo redukuje MTT, jeśli jest żywa albo nie redukuje, jeśli jest martwa) czy też możliwe jest zmniejszenie redukcji MTT przez żywe komórki o osłabionym metabolizmie? Doktorantka nie deklaruje jednoznacznej interpretacji redukcji MTT, gdyż naprzemiennie używa zwrotów „osłabienie aktywności metabolicznej komórek”, „przeżywalność” i „liczba żywych komórek”;

(xx) s. 92: „traktowanie komórek samym wapniem” jest zwrotem bardzo nieprecyzyjnym. Wapń jest metalem; komórki nie były traktowane metalicznym wapniem, lecz jonami wapnia.

(xxi) Wszystkie wykresy są niekompletnie opisane (brak podania parametru na osi odciętych, podane są jedynie wartości i to błędne w przypadkach wykresów 4.3-4.6, 4.9-4.12, 4.15-4.18, 4.21 i 4.27, bowiem podane wartości w woltach mogą być wartościami napięcia, ale nie natężenia pola elektrycznego, które wyraża się w V/m). Na wykresach powielana jest informacja: „Słupki błędów to średnie \pm SD”. Słupki przedstawiające na histogramach wartości średnie to nie są „słupki błędów”.

Opisy Rycin 4.3-4.6, 4.9-4.12 i 4.15-4.18 są nie w pełni zrozumiałe. Jedno porównanie to porównanie komórek poddanych elektroporacji z komórkami kontrolnymi (niczym nie traktowanymi) – i to jest jasne. Niemniej jednak, drugie porównanie to porównanie „do grupy komórek poddanych elektroporacji”. To już jest znacznie mniej jasne, a tak naprawdę zupełnie niejasne, gdyż symbole istotności statystycznej różnic pojawiają się przy komórkach poddanych elektroporacji. Ponadto, te same symbole mają różne znaczenie na różnych rycinach, np. symbol # oznacza różnice istotne dla $p = 0,0393$ na Ryc. 4.3 i różnice statystycznie istotne dla $p = 0,0182$ na Ryc. 4.5. Biorąc pod uwagę, jak wiele symboli użytych było w pracy, można było pójść o krok dalej i zadbać, by symbole nie zmieniały swoich znaczeń między jedną a drugą ryciną;

(xxii) s. 68: W Tab. 4.1 i 4.2 brak jest miar rozrzutu i wskutek tego oceny statystycznej istotności różnic.

Ogólnie jednak edycja pracy jest dobra i zasługuje na uznanie. W podsumowaniu stwierdzam, iż Doktorantka w przedstawionej do recenzji dysertacji wykazała się wysoką umiejętnością prowadzenia badań naukowych, właściwym doбором metod badawczych i umiejętnością wyciągania wniosków z uzyskanych wyników. Poczynione przeze mnie uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy i nie rzutują na jej pozytywną ocenę.

Uważam, że rozprawa spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim 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 późn. zm.).

Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Katarzyny Biezuńskiej-Kusiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Moje uwagi mają charakter edytorski i są łatwe do usunięcia albo wyjaśnienia. Nie zmieniają faktu, iż od strony wartości naukowej i rzetelności danych eksperymentalnych praca jest bardzo dobra.

Rzeszów, dnia 16 czerwca 2021

Prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz

Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Kierownik Pracowni Biochemii Analitycznej
I. Sadowska - Bartosz
prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz