

Sosnowiec/23-05-2018 r.

Zakład Biologii Komórki
Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny
Laboratoryjnej 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 Anny Szewczyk (zd.Zielichowskiej)
pt.: "Modulacja odpowiedzi komórkowej w liniach komórek
mięśniowych i nowotworowych inicjowana elektroporacją
w obecności jonów wapnia"**

**Promotor pracy: dr hab. Małgorzata Daczewska, prof.UWr
Promotor pomocniczy dr hab. Julita Kulbacka**

Tematyka rozprawy doktorskiej Pani Anny Szewczyk (zd.Zielichowskiej), jak i pozostały dorobek naukowy Doktorantki, dotyczą oceny zjawisk jakie mają miejsce po zastosowaniu metody elektroporacji (EP). Metoda ta - bardzo prosta w swoich założeniach - polega na wykorzystaniu pola elektromagnetycznego do krótkotrwałego wytworzenia hydrofilowych porów w błonie komórkowej, dzięki czemu możliwy staje się wzmożony transport różnych cząsteczek do wnętrza komórki. Co bardzo istotne, przy zachowaniu odpowiednich parametrów, utrata ciągłości błony to proces odwracalny, a więc sam w sobie bez negatywnych skutków dla funkcjonowania komórek. Zjawisko to jest wykorzystane zarówno w badaniach naukowych dotyczących szeroko pojętej modyfikacji funkcjonowania komórek (zarówno już na poziomie cząsteczek biorących udział w procesach metabolicznych, jak związanej z modyfikacją materiału genetycznego komórki), w medycynie czy kosmetologii. Elektrochemioterapia (ECT) wykorzystująca zjawisko elektroporacji do dostarczania na większą skalę leków do wnętrza komórek jest już w wielu krajach metodą stosowaną w praktyce klinicznej. 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.

Elektrochemioterapia – to w założeniach metoda prosta, ale równocześnie – w odniesieniu do efektów – jeszcze nie odkryta, o ogromnych możliwościach i z wielkim potencjałem modyfikowania losów komórki.

Z tego powodu temat podjęty przed Doktorantką jest bardzo istotny i „przyszłościowy”.

Rozprawa doktorska przedstawiona mi do recenzji została przygotowana w oparciu o spójny tematycznie zbiór prac, na który składają się dwie indeksowane publikacje o IF=3,413 oraz IF=5,168:

- 1) Anna Zielichowska, Małgorzata Daczewska, Jolanta Saczko, Olga Michel, Julita Kulbacka: Applications of calcium electroporation to effective apoptosis induction in fibrosarcoma cells and stimulation of normal muscle cells. Bioelectrochemistry; 109 (2016) 70–78 IF 3,413; Pkt. MNiSW/KBN: 35.000; liczba cytowań: 5; data publikacji: styczeń 2016.
- 2) Anna Szewczyk, Julie Gehl, Małgorzata Daczewska, Jolanta Saczko, Stine Krog Frandsen, Julita Kulbacka: Calcium electroporation for treatment of sarcoma in preclinical studies. Oncotarget, 2018, Vol. 9, (No. 14), pp: 11604-11618. IF: 5.168, Pkt. MNiSW/KBN: 35.000; liczba cytowań 1; data publikacji: luty 2018.

Są to prace wieloosobowe, a Doktorantka jest tu pierwszym autorem. Obie prace skupiają się na roli wapnia w modulacji odpowiedzi prawidłowych komórek mięśniowych i komórek nowotworowych poddanych elektroporacji.

Przygotowane przez Doktorantkę opracowanie „Rozprawy doktorskiej” składa się z krótkiego i zwięzłego (1,5 stronicowego) streszczenia w języku polskim i angielskim, opisu celu badań, które zostały zamieszczone w publikacjach, wprowadzenia w zagadnienia jakie były podejmowane w pracach (dokładniejszy opis badanych nowotworów, znaczenia gospodarki wapniowej w funkcjonowaniu komórek mięśniowych, wpływu jonów wapnia na proliferację komórkową, znaczenia jonów wapnia w apoptozie, wreszcie krótki opis dotyczący elektroporacji i zmian gospodarki wapniowej w komórkach nowotworowych), dwóch publikacji wchodzących w skład „tematycznie spójnego zbioru artykułów” oraz podsumowania z wnioskami jakie autorzy prac sformułowali na podstawie uzyskanych wyników. Rozprawę doktorską zamyka wykaz piśmiennictwa na jaki powołuje się Doktorantka w opracowaniu. W dodatkowym rozdziale Doktorantka przedstawiła wykaz całego swojego dorobku naukowego (wykaz publikacji, wystąpień konferencyjnych, komunikatów zjazdowych, wykaz grantów naukowych w realizacji, których uczestniczyła i staże naukowe jakie odbyła) oraz zamieściła stosowne oświadczenia dotyczące udziału - jej i pozostałych autorów - w przygotowaniu prac będących podstawą rozprawy doktorskiej. W przypadku obu publikacji Doktorantka określa swój wkład na 60%, co też potwierdzają inni autorzy w swoich oświadczeniach odnoszących się ich udziału w planowaniu eksperymentów, badaniach i przygotowaniu później samej publikacji.

Celem opisanych w pracach badań było ustalenie optymalnych parametrów elektroporacji z jonami wapnia, która powodowałaby indukcję śmierci mięśniowych komórek nowotworowych przy jednoczesnym zachowaniu przy życiu komórek prawidłowych. Doktorantka wraz z pozostałymi badaczami zastosowała tu dwa modele badawcze: 1) *in vitro* oraz 2) *in vivo*. Model *in vitro* stanowiły dwie prawidłowe linie komórkowe: L6 – szczurze prawidłowe mioblasty mięśni szkieletowych i C2C12 – mysie prawidłowe mioblasty mięśni szkieletowych oraz dwie linie nowotworowe: Wehi-164 – mysie komórki włókniakomięsaka (*Fibrosarcoma*) i RD – ludzkie komórki mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego (*Rhabdomyosarcoma*). Badania w układzie *in vivo* prowadzono na myszach NMRI-*Foxn1nu* z podskórnie rosnącym ludzkim mięśniakomięśakiem prążkowanokomórkowym.

Doktorantka na podstawie przeprowadzonych przez siebie badań i wyników opublikowanych w dwóch artykułach, które wskazuje jako podstawę rozprawy doktorskiej, stwierdza, że: *...”po raz pierwszy wykazano skuteczność metody opartej na elektroporacji z wapniem (CaEP) w procesie redukcji przeżywalności komórek nowotworów mięśniowych in vitro i in vivo”...* oraz, że: *...”wykazano także wpływ metody CaEP na procesy wewnątrzkomórkowe zachodzące zarówno w mięśniowych komórkach nowotworowych, jak i prawidłowych”...* - co oznacza, że tak zoptymalizowano parametry terapii, aby jony wapnia powodowały śmierć komórek nowotworowych przy równoczesnej stymulacji komórek prawidłowych. Doktoranta sama stwierdza, że chociaż inni badacze (np.: Hojman i wsp. - Hojman P, Brolin C, Gissel H. Calcium influx determines the muscular response to electrotransfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012; 302:446-53 czy Porter i wsp. - Porter GA Jr, Makuck RF, Rivkees SA, Reduction in intracellular calcium levels inhibits myoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2002; 277(32):28942-7) udowodnili już, że zarówno pole elektryczne jak i obecność jonów wapnia są niezbędne do proliferacji i różnicowania się komórek prawidłowych, to połączenie obu elementów (jonów wapnia i elektroporacji, CaEP) zastosowanych do pobudzenia komórek mięśniowych, jest nowością, zarówno w aspekcie terapii przeciwnowotworowych, jak i w dziedzinie regeneracji włókien mięśniowych.

Doktorantka wraz z pozostałymi autorami prac będących podstawą rozprawy doktorskiej, opisuje szereg zmian jakie powoduje terapia CaEP w badanych komórkach nowotworowych udowadniając jednocześnie, że można tak dobrać parametry terapii, aby nie miały negatywnego wpływu na komórki prawidłowe.

Najistotniejsze wnioski z prac dotyczą molekularnych mechanizmów zmian jakie zaobserwowano przy wybranych parametrach terapii w komórkach nowotworowych i prawidłowych. Wskazują one, że terapia CaEP w przyjętych w pracy warunkach:

- ✓ znacząco redukuje przeżywalność komórek nowotworowych (linia Wehi-164 i RD) – poprzez wewnątrzkomórkowy wzrost poziomu wapnia (nawet 5-krotny) w komórkach RD i RD-D, obniżenie ekspresji systemu pomp i kanałów wapniowych PMCA (pompa wapniowa zależna od ATP), NCX1 (wymiennik sodowo-wapniowy), RyR1 (receptor rianodynowy) w komórkach *Rhabdomyosarcoma*, zahamowanie ekspresji wydzielniczej fosfolipazy A2 (sPLA2) w komórkach Wehi-164 czy wreszcie poprzez zmiany w obrębie cytoszkieletu (struktura włókien aktynowych, degradacja białka wspomagającego cytoszkielet – zyksyny, zmiana struktury jądra, pęcznienie mitochondriów) – co sprzyja wejściu komórek na drogę apoptozy; badania *in vivo* przeprowadzone na myszach NMRI-Foxn1Nu transfekowanych ludzkimi komórkami mięśniakomięśaka prążkowanokomórkowego pokazują wpływ CaEP na rozmiar guza
- ✓ w przypadku komórek prawidłowych CaEP nie tylko nie wywołuje niekorzystnych efektów, ale wręcz poprawia ich funkcjonowanie – zwiększa proliferację, różnicowanie, obniża ekspresję RyR1 po terapii, co potencjalnie chroni komórki przed całkowitym opróżnieniem wewnętrznych magazynów wapniowych i dodatkowym napływem jonów wapnia do cytozolu, nie niszczy struktury cytoszkieletu, a zyksyna akumulując się wzdłuż włókien aktynowych zwiększa wręcz ich wytrzymałość na działanie pola elektrycznego, zwiększa się liczba szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, wolnych rybosomów oraz różnorodnych pęcherzyków wydzielniczych, co świadczy o intensyfikacji procesów wymiany i syntezy.

Mimo tak interesujących wyników jakie uzyskała Doktorantka w swoich badaniach, jak sama stwierdza: *...„mechanizmy molekularne panujące nad utrzymaniem prawidłowej homeostazy wapniowej są jednak wysoce skomplikowane i wymagają dalszych analiz”....* – co dobrze świadczy o podejściu Doktorantki do badań naukowych, krytycznym spojrzeniu na wyniki jakie uzyskała i świadomości tego, że są one dopiero wycinkiem – ułamkiem wiedzy procesów jakie mogą zachodzić w komórkach po elektroporacji w obecności jonów wapnia, konieczności uzupełniania tej wiedzy i ostrożności przy jej praktycznym wykorzystaniu.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr *Anny Szewczyk (zd.Zielichowskiej) pt.: „Modulacja odpowiedzi komórkowej w liniach komórek mięśniowych i nowotworowych inicjowana elektroporacją w obecności jonów wapnia”* 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 Wysokiej Rady Wydziału Nauk

Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Anny Szewczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie z uwagi na walory aplikacyjne pracy oraz wysoką wartość przygotowanego opracowania, które dowodzi, że elektroporacja w połączeniu z jonami wapnia może być nową drogą zarówno w dziedzinie regeneracji komórek, jak i w kontekście innowacyjnych terapii przeciwnowotworowych, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Mgr Anny Szewczyk (zd.Zielichowskiej).

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



Dr hab.n.med. Małgorzata Latocha

Sosnowiec, 23.05.2018 r