



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Prof. dr hab. inż. Barbara Jachimska,
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk

Kraków 30.11.2022

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Sandry Skorupskiej

pt. „Badania and wykorzystaniem elektroporacji do kontrolowanego wprowadzania cząsteczek leków do komórek”

Przedstawiona praca doktorska mgr inż. Sandry Skorupskiej powstała na Wydziale Chemicznym w Katedrze Biotechnologii Medycznej Politechniki Warszawskiej pod kierunkiem dr hab. inż. Ilony Grabowskiej-Jadach.

Tematyka rozprawy skupia się na wykorzystaniu elektroporacji (EP) do kontrolowanego wprowadzania cząstek leku do komórek. Istotnym problemem terapii nowotworowych jest kwestia skutecznego dostarczania cytostatyków do wnętrza komórki przy jednoczesnym minimalizowaniu skutków ubocznych. Impulsy elektryczne o wysokim natężeniu pola elektrycznego mogą indukować proces permeabilizacji błony komórkowej zwanej elektroporacją. Metoda została zapoczątkowana w latach siedemdziesiątych, a obecnie stosowana jest do dostarczania cząstek aktywnych (leków, kosmetyków) do wnętrza komórki, transferu genów, wbudowywania białek czy też fuzji komórek. Nadal prowadzone są intensywne badania mające na celu zweryfikowanie możliwości zastosowania tej metody w szerszym kontekście. Kluczowe jest zrozumienie zarówno mechanizmu powstawania porów w błonie komórkowej w wyniku działania zewnętrznego pola elektrycznego jak i optymalizacji układu poprzez odpowiednie dobranie zarówno natężeniu pola elektrycznego jak i częstotliwości impulsów elektrycznych. Autorka rozprawy podjęła się zadania znalezienia odpowiedzi na istotne zagadnienia związane bezpośrednio z zastosowaniem metody elektroporacji w układach komórkowych do leczenia czerniaka. Rozprawa obejmuje

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

badania prowadzono na wybranych modelach komórkowych w tym zawieszanie komórkowej, monowarstwie komórkowej, układach wielokomórkowych takich jak trójwymiarowe sferoidy oraz mikroukładach przepływowych. Do weryfikacji efektywności procesu elektroporacji wybrano cytostatyki takie jak 5-fluorouracyl, dokсорubicyna, oksaliplatyna oraz chlorek wapnia. Zaprojektowano dwa mikrosystemy przepływowe dedykowane do prowadzenia elektroporacji z elektrodami ze złota oraz tlenku cyny indu (ITO), uwzględniając kształt stosowanych elektrod oraz geometrię układu. W kontekście zaprezentowanych badań, tytuł rozprawy jest zbyt ogólny, biorąc pod uwagę pionierskie prace prof. Eberharda Neumanna dotyczące EP zapoczątkowane w latach 70-tych a którymi obecnie zajmuje się prężnie działające International Society for Electroporation- Based Technologies and Treatments (ISEBTT).

Rozprawa doktorska napisana jest w języku polskim i ma charakter eksperymentalny. Obejmuje łącznie 178 stron i składa się z 12 głównych rozdziałów. Praca na wstępie zawiera streszczenie w języku polskim oraz angielskim. Kolejno przedstawiono spis treści oraz wykaz skrótów stosowanych w pracy wraz z nazewnictwem zastosowanych linii komórkowych. Praca podzielona jest na część teoretyczną i doświadczalną. Pierwszy rozdział części teoretycznej poświęcony jest problematyce chorób nowotworowych oraz strategii ich leczenia, ze szczególnym uwzględnieniem elektroporacji w tym stosowanych elektrod i leków. Drugi rozdział dotyczy modeli komórkowych stosowanych w testach in vitro. W tej części omówiono zastosowanie zawiesin komórkowych, monowarstw komórkowych, sferoid oraz mikrosystemów przepływowych. Autorka opisała typy mikrosystemów stosowanych do elektroporacji, uwzględniając zarówno zalety jak i wady poszczególnych układów. Zaprezentowano kryteria jakie powinny spełniać leki stosowane w elektroporacji oraz omówiono najczęściej stosowane. Przegląd literaturowy kończy zwięzłe podsumowanie, w którym podkreślono przyczyny poszukiwania nowych, skutecznych i bezpiecznych terapii nowotworowych. W tym aspekcie elektrochemioterapia (ECT) może stanowić alternatywę dla innych konwencjonalnych terapii stosowanych w leczeniu nowotworów.

Część doświadczalna zaczyna się od przedstawienia celu pracy oraz hipotez badawczych. Autorka postawiła trzy hipotezy badawcze, które sformułowała następująco:

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351



- zewnętrzne pole elektryczne może być stosowane do kontrolowanego i efektywnego wprowadzania cząsteczek do komórek zarówno w zawieszynie komórkowej, monowarstwie jak i wielokomórkowych sferoidach.

- 5-fluorouracyl, doksorubicyna, oksaliplatyna oraz chlorek wapnia mogą znaleźć zastosowanie w elektrochemioterapii.

- zaprojektowany i wytworzony mikrosystem przepływowy do elektroporacji komórek może być wykorzystany do kontrolowanego i efektywnego wprowadzania cząstek do komórek.

Hipotezy badawcze powinny być doprecyzowane, gdyż dotyczą zastosowania wybranych substancji aktywnych w leczeniu czerniaka przy użyciu elektrochemioterapii. Jak sama Autorka przedstawiła w podsumowaniu, istnieją już doniesienia literaturowe w zakresie zastosowania ECT w leczeniu wybranych rodzajów nowotworów testowane na różnych formach komórkowych.

Poszczególne rozdziały części eksperymentalnej obejmują przedstawienie zastosowanych metod badawczych oraz zestawienie wyników serii pomiarowych dotyczących elektroporacji zawiesin, elektroporacji komórek w postaci monowarstwy, elektroporacji sferoidów i mikrosystemów do elektroporacji. Badania prowadzone dla sferoid oraz mikroukładów przepływowych miały na celu przybliżyć układ pomiarowy do warunków panujących *in vivo*. Wpływ elektroporacji dla różnych modeli komórkowych prowadzono z zastosowaniem dwóch linii komórkowych skóry tj. prawidłowych HaCaT oraz nowotworowych A375. Żywotność komórek określano stosując test MTT w przypadku zawiesiny komórkowej oraz monowarstwy komórkowej. W badaniach prowadzonych dla sferoid zastosowano test Almar Blue. Efektywność elektroporacji kontrolowano poprzez zmianę intensywności fluorescencji jodku propidyny oraz estru kalceiny. Przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego potwierdzono tworzenie porów w błonie komórkowej w procesie elektroporacji. We wszystkich seriach pomiarowych weryfikowano efektywność działania cytostatyków należących do różnych grup, a tym samym różniących się mechanizmem działania. W badaniach zastosowano 5-fluorouracyl (5FU)- lek przeciwnowotworowy z grupy antymetabolitów, doksorubicynę (DOX)- antybiotyk cytostatyczny naturalnego pochodzenia, oksaliplatynę (OXA)- cytostatyk alkilujący. Ponadto elektroporację prowadzono przy obecności chlorku wapnia lub azotanu wapnia. W przypadku zastosowania 5-fluorouracylu obserwowano najlepszą efektywność działania leku zarówno w



przypadku zawiesiny komórkowej, monowarstwy komórkowej jak i układów sferoidalnych. Dla doksorubicyny nie otrzymano statystycznie istotnych zmian po zastosowaniu elektroporacji we wszystkich modelach komórkowych, a tym samym Autorka nie rekomendacji DOX w leczeniu czerniaka. Zastosowanie oksaliplatyny indukowało wzrost śmiertelności komórek po elektroporacji w stosunku do samej inkubacji dla wszystkich stosowanych modeli komórkowych, przy jednoczesnym braku wzrostu śmiertelności komórek prawidłowych. W przypadku jonów wapnia wyniki otrzymane dla badanych układów nie są tak obiecujące jak dane literaturowe, zwłaszcza że leczenie czerniaka CaCl_2 z EP jest już stosowane klinicznie. Prekursorem takiego typu terapii jest grupa prof. J. Gehl. Autorka wskazuje jednak na potencjalne zastosowanie chlorku wapnia w leczeniu czerniaka, ponieważ otrzymano statystycznie istotny spadek żywotności komórek A375 po ich elektroporacji w obecności tych jonów. Podsumowując na podstawie przeprowadzonych serii pomiarowych zaobserwowano istotne różnice w odpowiedzi komórek A375 oraz HaCaT w zależności od wybranego leku jak i zastosowanego modelu komórkowego.

Generalnie przedstawione wyniki są rzetelne i dobrze udokumentowane, to jak zawsze w badaniach naukowych, interpretację i dyskusję można poszerzyć i pogłębić. Jest to jednak wspólna immanentna cecha dotycząca prac eksperymentalnych. Pragnę podkreślić, że badania dotyczą szerokiego obszaru badawczego, a ich główną wartością jest szczegółowy opis uzyskanych wyników, dzięki czemu można łatwo zaplanować dalsze kierunki prac. Jako najcenniejsze moim zdaniem jest zastosowanie równolegle kilku systemów hodowli komórkowych do weryfikacji procesu elektroporacji tych samych układów. Na szczególną uwagę zasługują serie pomiarowe prowadzone z wykorzystaniem trójwymiarowych sferoidów oraz układów mikroprzepływowych, gdyż najlepiej symulują warunki *in vivo*. W obu przypadkach do badań zastosowano specjalnie zaprojektowane moduły pomiarowe. Ponadto w zaprojektowanych układach mikroprzepływowych równolegle monitoruje się wpływ pola elektrycznego oraz wybranego leku w czasie tego samego pomiaru, co podnosi zarówno efektywność badań jak i ich powtarzalność. Dodatkowo w układach przepływowych istnieje możliwość monitorowania potencjału błonowego oraz migracji wybranych jonów w czasie rzeczywistym.



Pomimo pozytywnej opinii dotyczącej przedłożonej pracy doktorskiej, chciałabym, aby Autorka odpowiedziała na kilka pytań, które są ważne dla pełnego zrozumienia istoty zagadnienia, którym się zajmowała:

- Bardzo lakonicznie omówiła Autorka proces tworzenia porów w membranie komórkowej przy zastosowaniu zewnętrznego pola elektrycznego. Przedstawienie obecnie stosowanych modeli (dynamika molekularna) byłoby pomocne w zrozumieniu mechanizmu tego procesu. Należałoby podkreślić, iż podczas elektroporacji cząsteczki lipidów nie ulegają chemicznej zmianie, ale przegrupowując się tworzą por, który działa jako kanał transportowy przez dwuwarstwę.
- W zależności od długości trwania impulsu (nanosekundowy, mikrosekundowy), oraz natężenia pola elektrycznego mamy do czynienia z innym typem elektroporacji, której działanie na błonę komórkowa jest zgoła odmienne. To zapewne wyjaśniłoby dobór parametrów pola elektrycznego zastosowanego w pracach badawczych.
- Stosowane w terapii nowotworowej cytostatyki charakteryzują się odmiennym indeksem terapeutycznym. Porównanie który z użytych leków przy zastosowaniu niższej dawki terapeutycznej stosując EP indukuje efekt komórkowy na tym samym poziomie, byłoby istotnym parametrem procesu.
- W tabeli 1 zamieszczonej na stronie 25 zestawiono dane dla poszczególnych leków przeznaczonych do aplikacji ECT. W tabeli brak informacji dla jakich komórek zostały przeprowadzone badania dla poszczególnych leków uwzględnionych w wykazie. Należy wziąć pod uwagę, iż zależnie od rodzaju cytostatyka jego stężenie cytotoksyczne będzie odmienne i specyficzne względem rodzaju komórek nowotworowych.
- Przy interpretacji wyników należałoby zwrócić uwagę, że budowa membrany komórek prawidłowych jak i komórek nowotworowych jest odmienna, a tym samym należałoby się spodziewać różnicy w transporcie transbłonowym. Znalezienie korelacji pomiędzy transportem transbłonowym wywołanym procesem elektroporacji a typem komórek nowotworowych miałyby duży aspekt aplikacyjny (przykładowo zawartość cholesterolu w komórkach wpływa na ich przepuszczalność w obecności impulsów pola elektrycznego).
- W przypadku cząstek aktywnych ważnym aspektem będzie forma w jakiej występują w określonych warunkach środowiskowych. Dla cząstek obdarzonych ładunkiem elektrycznym ich transport przez membranę komórkową może być utrudniony.

Zyad



- Podsumowanie zawiera istotne wnioski końcowe, natomiast brak zestawienia wyników dla badanych cytostatyków dla różnych typów hodowli komórkowych. Zestawienie w formie graficznej pozwoliłoby na określenie istotnych trendów w zachowaniu się poszczególnych cytostatyków oraz różnic pomiędzy nimi.

Rozprawa jest bogato ilustrowana, co ułatwia czytelnikowi zrozumienie zarówno przyjętej koncepcji badań, jak i analizy otrzymanych wyników. Praca jest przygotowana w dobrym standardzie edytorskim, pomimo tego poniżej zawieram kilka uwag.

- Tytuł rozdziału numer 7 jest zbyt ogólny i powinien brzmieć: elektroporacja zawiesiny komórkowej.
- Pozycja literaturowa 128 oraz 129 są zdublowane.
- Opis zamieszczony na stronie 87 dotyczy rys. 28 a nie rys. 29.
- Bardzo trudno zweryfikować wyniki badań przedstawione na rys. 29, ze względu na ich wielkość.
- Na rys. 30 porównano zdjęcia SEM komórek A375 oraz HaCaT, niestety nie jest widoczna skala dla poszczególnych zdjęć. Jeżeli zastosowano identyczne powiększenie, to obserwowane zmiany topografii komórki pod wpływem pola elektrycznego w stosunku do układów wyjściowych są istotne.

Rozprawa doktorska zawiera obszerny warsztat metodologiczny dotyczący zastosowania EP w układach komórkowych. Autorka we właściwy sposób zrealizowała szeroki program badawczy umiejętnie planując i prowadząc eksperymenty laboratoryjne i dokonując starannej interpretacji danych. Opracowana przez doktorantkę metodologia badawcza ma dużą wartość poznawczą oraz aplikacyjną. Odpowiedni wybór szerokiej gamy metod eksperymentalnych dowodzi, iż mgr inż. Sandra Skorupska jest dojrzałym naukowcem zasługującym na stopień naukowy doktora nauk chemicznych.

Wyniki otrzymane w ramach realizacji pracy doktorskiej mgr inż. Sandry Skorupskiej obejmują sześć publikacji oraz rozdział w monografii. Wszystkie prace zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym: Bioelectrochemistry, Analytical Biochemistry, Nanotechnology, RSC Advances, Organs on a Chip. Cztery publikacje są w trakcie ewaluacji. W czterech publikacjach mgr inż. Sandra Skorupska jest głównym autorem. Przeprowadzone prace stanowią podstawę dwóch zgłoszeń



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

patentowych. Biorąc pod uwagę etap kariery naukowej dorobek Autorki oceniam na wyróżniający się.

Podsumowując, przedłożona do recenzji praca doktorska przedstawia istotną wartość pod względem poznawczym i aplikacyjnym, a tym samym posiada elementy nowości w zakresie dziedziny nauk chemicznych. W związku z tym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Sandry Skorupskiej pt. „Badania nad wykorzystaniem elektroporacji do kontrolowanego wprowadzania cząsteczek leków do komórek” spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 13. ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” oraz & 5 ust. 1 „Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków prowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora” (Dz. U. z 2018 r. poz. 261) oraz na podstawie art. 179. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. „Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669). Wobec powyższego wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Sandry Skorupskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. inż. Barbara Jachimska