

20.11.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej
Mgr inż. Sandry Skorupskiej
Z Katedry Biotechnologii Medycznej
Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej

Rozprawa doktorska mgr inż. Sandry Skorupskiej „Badania nad wykorzystaniem elektroporacji do kontrolowanego wprowadzania cząsteczek leków do komórek” dotyczy zastosowania pola elektrycznego do wprowadzania cząsteczek do komórek. W wyniku zastosowania impulsów elektrycznych w błonie komórkowej tworzą się pory, przez które do wnętrza komórek mogą dostawać się związki małowcząsteczkowe, makromolekuły, a nawet kropki kwantowe. Proces ten to elektroporacja. Elektrochemioterapia to rozwijająca się metoda leczenia nowotworów, w której elektroporacja pozwala na skuteczniejsze wnikanie leków, co pozwala na zastosowanie mniejszej dawki oraz stosowanie leków, które w innych warunkach słabo przenikają do komórek. W rozprawie opisano wyniki elektroporacji zawiesin, monowarstw oraz sferoidów komórkowych. Przeprowadzono również doświadczenia z wykorzystaniem mikroukładów przepływowo-ych. Zbadano różnice między układami modelowymi. Podjęto próbę określenia jak parametry procesu (np. kształt elektrod, odległość między nimi) wpływa na wydajność elektroporacji czterech czynników o potencjale terapeutycznym. Czynniki te to 5-fluorouracyl, doksorubicyna (DOX), oksaliplatyna (OXA) i chlorek wapnia. Tematyka badawcza jest interesująca i ważna.

Rozprawa podzielona jest na dwie główne części: „teoretyczną” (rozdziały 1 do 3) oraz „doświadczalną” (rozdziały 4 do 10). Rozdział 11 to „Podsumowanie”, a rozdział 12 to „Bibliografia”, w której wymieniono 149 odnośników literaturowych. Dołączony jest również wykaz skrótów. Streszczenie i słowa kluczowe zamieszczone są w dwóch językach: polskim i angielskim. Rozprawa spisana została na 178 stronach, na których zamieszczono 80 rysunków.

Wyniki opisane w rozprawie zostały częściowo opublikowane w dwóch artykułach w bardzo dobrych czasopismach naukowych. Ponadto mgr inż. Skorupska jest współautorką czterech innych artykułów (Scopus, 2022.11.20), rozdziału w książce, doniesień pokonferencyjnych, oraz dwóch zgłoszeń patentowych. Dorobek ten oceniam bardzo wysoko.

Promotorką rozprawy jest dr hab. inż. Ilona Grabowska – Jadach, prof. PW, która w swojej pracy badawczej zajmuje się badaniem cytotoksyczności nanomateriałów, zastosowaniem terapii fototermicznej, wykorzystaniem elektroporacji i badaniem skuteczności chemioterapii wspomaganą elektroporacją.

Jakość rozprawy jest bardzo nierówna. Części ciekawe (np. projektowanie układów do elektroporacji monowarstw oraz układów mikrofluidycznych, wyniki elektroporacji monowarstw z 5-fluorouracylem oraz DOX) przenikają się z fragmentami słabszymi. Jednym z moich najważniejszych zastrzeżeń jest kwestia wewnętrznej spójności uzyskanych wyników. Ponieważ badano wnikanie czterech związków, przedstawione zostały cztery zestawy wyników dla tych samych parametrów elektroporacji (badanie komórki, parametry elektroporacji itd.). Każdy z tych zestawów zawierał wyniki prób kontrolnych dla próbek elektroporowanych bez leku. Ponieważ były to de facto identyczne próbki należałoby oczekiwać bardzo zbliżonych wyników. W wielu miejscach jednak te cztery wyniki są ze sobą niespójne.

W rozdziale 7, który dotyczył elektroporacji komórek w postaci zawiesin, wyniki prób kontrolnych,



pokazujące żywotność komórek A375 poddanych elektroporacji (900 V, 1 puls, 10 ms) bez leku, zamieszczone są na rysunku 13a (choć tutaj nie podano czasu po jakim wykonano test MTT – na podstawie rozdziału 6.4 można jednak sądzić, że było to 24h, jak w przypadku pozostałych wyników w rozdziale 7), rys 16a, 18a, 20a, oraz 23a. Już na wykresach widać, że wartości różnią się (czasem znacznie), mimo że dotyczą dokładnie takiej samej próbki. W opisach wyników również podano różne wartości. Poniżej przytaczam adekwatne cytaty ilustrujące problem.

- strona 70 (dotyczy rys. 16a) „W przypadku obydwu linii komórkowych sama elektroporacja spowodowała zmniejszenie żywotności o około 10-15% zarówno po 24h jak i 48h od rozpoczęcia testu.”,
- strona 73 (dotyczy rys. 18a): „Elektroporacja spowodowała zmniejszenie żywotności komórek A375 do 95% po 24h”;
- strona 76 (dotyczy rys. 20a): „Działanie pola elektrycznego na komórki nowotworowe spowodowało zmniejszenie ich żywotności prawie o 20%”;
- strona 80 (dotyczy rys. 23a) napisano: „Żywotność komórek nowotworowych inkubowanych ze związkami wynosi ok. 90% i maleje zaledwie o kilka procent w porównaniu do kontroli dla próby elektroporowanej”.

Dla jasności należy przytoczyć cytaty ze strony 52, gdzie napisano, że badania „prowadzone były (...) na dwóch liniach komórkowych skór: prawidłowej HaCaT oraz nowotworowej A375”. Dlatego należy rozumieć stwierdzenie „komórki nowotworowe” jako linię A375.

Skoro sama procedura elektroporacji może powodować zmniejszenie żywotności komórek od 5% do nawet 20% w zależności od próbki to wnioskowanie o skuteczności konkretnego leku w wielu przypadkach może być nieuzasadnione. Szczególnie, że największe spadki żywotności A375 po 24h z jednoczesnym zastosowaniem leku i elektroporacji przedstawione w tym rozdziale to mniej niż 50% (zazwyczaj efekt był mniejszy).

Podobna sytuacja ma miejsce w rozdziale 9. Wyniki na rysunkach 36b, 41b, 45b oraz 50b dotyczą próbek kontrolnych, tj. tych samych sferoidów A375 wystawionych na ten sam proces elektroporacji (bez leku). Jednak różnice w wynikach są znaczące – od cytuję: „Sama elektroporacja nieznacznie wpłynęła na zwiększenie liczby komórek martwych w strukturze sferoidu” (strona 113) do „Elektroporacja sferoidów spowodowała znaczne zwiększenie ilości komórek martwych w ich całej objętości” (strona 118). Oba cytaty dotyczą komórek A375.

Jeszcze wyraźniej niespójność wyników jest widoczna po analizie danych na rysunkach 35b, 40b, 44b oraz 49b. Wyniki te dokumentują zmiany rozmiarów sferoidów komórek A375 pod wpływem elektroporacji (bez leku). Uzyskane wyniki wahają się od +30% (rysunek 35b, 40b) przez +10% (rysunek 44b) do -10% (rysunek 49b). Ponownie widać, że same pomiary są obciążone dużą zmiennością.

Inny przykład to wyniki na rysunku 35f (elektroporacja, 5-fluorouracyl $c=192 \mu\text{M}$), gdzie udało się zmierzyć wielkość sferoidów, ale już dla tej samej próbki badanej pod mikroskopem stwierdzono (rysunek 36), że „elektroporacja z lekiem spowodowała rozpad sferoidu”. To samo dotyczy rysunków 40f i 41f. Czyli w jednym pomiarze sferoidy były, a w drugim uległy rozpadowi (dla identycznych warunków).

Moje podejrzenie, które musi być rozwiane, dotyczy ilości powtórzeń pomiarów. Wydaje się, że przynajmniej niektóre wyniki w rozdziałach 7, 9 oraz 10, pochodzą z pojedynczych eksperymentów, a wskazana ilość powtórzeń (n) dotyczy powtórzeń technicznych, dla pojedynczej próbki. Rozdział 6.19 („Metodyka badawcza” > „Statystyka”) odpowiada opisom w artykułach, których Doktorantka jest



współautorką (Bioelectrochemistry, 2019, 126, pp. 86–911 oraz Sensors and Actuators B: Chemical, 2022, 351, 130889), ale z jedną, kluczową, zmianą. W rozprawie brakuje bardzo ważnego zdania, które znajduje się w publikacjach, mianowicie: „*All experiments were performed in three independent repetitions, 5 replications each*”.

Proszę również o dodatkowe wyjaśnienia dotyczące wyników w rozdziale 9, gdzie wskazano $n=2$. Czy wyniki zmian wielkości sferoidów analizowano na podstawie dwóch sferoidów w równoległym eksperymencie?

W rozdziałach 7 do 9 podpisy pod rysunkami wprost wskazywały ilość powtórzeń (n). Nie jest jasne, czy to były powtórzenia techniczne, czy biologiczne, ale ta informacja była podana. Brak jest jej jednak w podpisach pod rysunkami o numerach od 65 do 78 w rozdziale 10.

W tym kontekście ciekawa jest analiza wyników w rozdziale 8, który dotyczył elektroporacji monowarstw komórek. Wartość kontroli K EP (kontrola po elektroporacji, ale bez leku) na rysunkach 31a i 32a jest identyczna (tj. 5-fluorouracylu i DOX, czyli związków pokazanych w publikacji Sensors and Actuators B: Chemical, 2022, 351, 130889), ale 33a (OXA) i 34a (jony wapnia) już nie. Należy zaznaczyć, że w tym układzie różnice te nie są duże. Ponadto wynik OXA + EP dla HaCaT (rysunek 33b) pokazują większą żywotność niż samo EP, i to aż o około 20% (po 48h). W przypadku mniejszej żywotności komórek uznawane jest to za dowód skuteczności elektrochemioterapii. Wskazuje to, że wyniki, które przeszły przez sito recenzentów w czasopiśmie Sensors and Actuators B: Chemical (5-fluorouracyl oraz DOX) są spójne i dobrze opisane, natomiast wyniki dodane w rozprawie (OXA, Ca^{2+}) wydają się „pochodzić” z innych serii pomiarowych, dla których liczba powtórzeń biologicznych mogła być mniejsza.

Różnice między eksperymentami mogą być znaczące i mogą nie zależeć od eksperymentatora (np. w której fazie cyklu komórkowego podawany był impuls). Dlatego konieczne jest precyzyjne wskazanie które wyniki przedstawione w rozprawie nie były wykonane w trzech powtórzeniach biologicznych. Problem dotyczący powtórzeń „technicznych” (replicates) i „biologicznych” (repetitions) był wielokrotnie podnoszony w literaturze, np. Bell, BMC Biol. 2016; 14: 28, Blainey et al., Nature Methods 11, 879–880 (2014).

Rozrzut wyników dla próbek kontrolnych, które powinny być bardzo zbliżone do siebie, niezwykle utrudnia analizę wyników. Przytoczone przykłady to nie są drobne zmiany. Przedstawione wyniki działania leków i leków z elektroporacją często nie są znacząco lepsze niż zmienność w samych próbkach kontrolnych. Może to mieć to dramatyczny wpływ na analizę wyników, szczególnie na analizę statystyczną. W mojej ocenie ponownie wykonana analiza statystyczna uzyskanych wyników może mieć wpływ na wnioski przedstawione w rozdziale podsumowującym całą rozprawę. Bardzo proszę o komentarz, wskazanie ilości powtórzeń biologicznych i technicznych dla wszystkich serii pomiarowych, oraz wytłumaczenie jeżeli zdecydowano się zmniejszyć ilość powtórzeń w stosunku do ogólnie przyjętych standardów.

Rozdziały 1, 2 i 3

„Część teoretyczna” jest w istocie przeglądem literatury i nie zawiera żadnych teoretycznych rozważań dotyczących procesu elektroporacji. W mojej ocenie bardziej adekwatny tytuł to „Część literaturowa”. Część ta składa się z trzech rozdziałów zatytułowanych: „Choroby nowotworowe”, „Modele komórkowe w testach *in vitro*” oraz „Podsumowanie”. Historia nakreślona przez doktorantkę jest spójna. Zaczyna się od chorób nowotworowych i konieczności rozwijania metod ich leczenia. Elektrochemioterapia



opisana jest jako jedna z obiecujących terapii. Pozwoliło to płynnie przejść do zagadnień bezpośrednio związanych z elektroporacją, która ułatwia dostawanie się leków do wnętrza komórek. Dalej, wskazane są „Wyzwania” (sekcja 1.3). Jako narzędzia wykorzystywane w badaniach opisane są modele komórkowe (zawiesiny, monowarstwy i sferoidy) oraz mikrosystemy, w szczególności przepływowe. Rozdział kończy się opisem badanych w pracy związków: 5-fluorouracylu, doksorubicyny (DOX), oksaliplatyny (OXA) i chlorku wapnia.

W mojej ocenie część teoretyczna jest zbyt zwięzła. Największym mankamentem jest brak opisu mechanizmu elektroporacji. W rozprawie odnalazłem tylko dwa fragmenty, dotyczące tego zjawiska:

- (strona 21) „Elektroporacja polega na poddaniu komórek działaniu zewnętrznego pola elektrycznego w wyniku czego dochodzi do destabilizacji błony komórkowej i powstawania w niej hydrofilowych porów, będących dodatkową drogą migracji dla cząsteczek”, oraz
- (strona 44) „Sam mechanizm permeabilizacji błony komórkowej pod wpływem przyłożonego napięcia nie jest jednoznacznie wyjaśniony. Badania dotyczące kinetyki oraz mechanizmu tego procesu wymagają rozszerzenia. Rozważania teoretyczne na temat elektroporacji wciąż opierają się na prostych założeniach (np. sferyczny kształt komórki, brak jej rotacji, puchnięcia w trakcie procesu). Dodatkowo, procesy towarzyszące permeabilizacji błony komórkowej, takie jak zmiana potencjału błonowego, czy transport jonów innych cząsteczek do i z komórki, powinny zostać wzięte pod uwagę w analizach [121]. Zrozumienie podstaw teoretycznych oraz procesu za pomocą bardziej kompleksowych równań uwzględniających wszystkie czynniki mające wpływ na efekt elektroporacji, pozwoli lepiej pojąć ją samą, a także przewidywać jej skutki z większym prawdopodobieństwem”.

To zdecydowanie zbyt lakoniczny i powierzchowny opis by wprowadzić czytelnika w problem poruszany w dysertacji. Jako przykłady literaturowe (jest ich zdecydowanie więcej) wskazuję dwie prace przeglądowe (Annu. Rev. Biophys. 2019. 48:63–91 oraz Chem. Rev. 2022, 122, 13, 11247–11286). Jedna z prac pochodzi z 2022 roku i mogła nie być dostępna w czasie przygotowania rozprawy, ale teksty źródłowe tam opisane powinny być Doktorantce znane. Opis mechanizmu powstał na podstawie zarówno eksperymentów, jak i symulacji, których znaczenie Doktorantka zdaje się umniejszać pisząc „Rozważania teoretyczne na temat elektroporacji wciąż opierają się na prostych założeniach” (strona 44). W rozprawie nie odnalazłem rozważań dotyczących np. przepływu prądu przez układ. Doktorantka nie opisała, czy na elektrodach zachodzą reakcje redox a w układzie płynie prąd, czy jednak głównym czynnikiem oddziałującym z komórkami jest pole elektryczne, a sam przepływ prądu nie jest kluczowy (np. w związku z krótkim czasem trwania impulsów). Ponieważ badania i optymalizacja elektroporacji są rdzeniem rozprawy, brak opisu samego procesu uważam za duży minus.

Brak bardziej szczegółowego opisu procesu często pozostawia czytelnika z pytaniem „dlaczego”. Przykładem są stwierdzenia: „rekomendowane jest podanie 8 impulsów o czasie trwania 100 us każdy i zastosowania pola elektrycznego o natężeniu 1000 V/cm”, oraz zdanie „polecane jest też wykorzystanie generatora napięć Cliniporator”. Nie opisano jak proces elektroporacji zależy od ilości impulsów i czasu ich trwania. Pobieźnie wspomniana jest też zależność od natężenia pola. Nie wiadomo czym Cliniporator odróżnia się od innych urządzeń. Nie jest też jasne, dlaczego Doktorantka nie stosuje tego urządzenia w swoich badaniach, skoro jest to zalecane.

Na stronie 21 napisano, że rozmiary utworzonych w wyniku elektroporacji porów „wahają się od 1 do nawet 80 nm”. W odnośniku, który został podany przy tej informacji (referencja 28, Bioelectromagnetics 20:194–201 (1999) 1521186x, 1999) nie odnalazłem danych na poparcie tego

stwierdzenia. Co więcej, w przywoływanej już wcześniej pracy przeglądowej (Chem. Rev. 2022, 122, 13, 11247–11286) autorzy piszą: „Pores with radii or at least ~ 0.8 nm reach an energy minimum, in which pores are stable even after the removal of the electric field. At a wider radius, the membrane is irreversibly porated past a second energy maximum”. Również Saulis i Saule (Biochimica et Biophysica Acta 1818, 12, 2012, 3032–3039) traktują pory o wielkości 0.8 nm jako duże. Większe pory oczywiście można uzyskać, ale zmniejsza to przeżywalność komórek, a zgodnie ze zdaniem na stronie 22 rozprawy w „electrochemioterapii stosowana jest elektroporacja odwracalna”. Dokładniejszy opis wielkości tworzonych porów, również w funkcji parametrów elektroporacji, powinien pojawić się w rozprawie, szczególnie w kontekście rozdziału 10.2.3.6.a, w którym pokazano przenikanie do wnętrza komórek kropek kwantowych o rozmiarze 3.7 nm.

Pobieżność opisów ujawnia się również w innych miejscach. Dla przykładu w rozdziale 1.1 opisane są metody leczenia nowotworów, ale pominięto ważne i szeroko stosowane terapie – terapię celowaną (którą American Cancer Society zdecydowanie odróżnia od chemioterapii (<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/targeted-therapy.html>)), terapię z wykorzystaniem komórek macierzystych, przeszczep szpiku czy terapię hormonalne.

Innym przykładem jest brak opisu wykorzystania elektroporacji w mikrobiologii (np. w procesie transformowania bakterii) lub w pracach dotyczących roślin. W mojej ocenie wzmianka taka byłaby znacznie bardziej odpowiednia niż np. opis zasady 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*). Sama zasada 3R jest niezwykle ważna, ale nie dotyczy elektroporacji, a rozprawa nie zawiera wyników eksperymentów z wykorzystaniem zwierząt. Dlatego poświęcenie zasadzie 3R półtorej strony (strony 28 – 29) z około 34 stron „części teoretycznej” uważam za złą decyzję.

Kolejnym zagadnieniem, na które pragnę zwrócić uwagę jest brak precyzji w sformułowaniach Doktorantki. Dla przykładu na stronie 17 znajduje się zdanie: „Ze względu na właściwości fizykochemiczne leków, dostarczenie ich do komórek nowotworowych jest bardzo często skomplikowane i nieefektywne”. Nie wiadomo jednak jakie konkretnie właściwości fizykochemiczne leków Doktorantka ma na myśli (ładunek, rozmiar, rozpuszczalność?) ani konkretnie jak często jest to problem i na jaką efektywność można liczyć. W innych fragmentach Doktorantka pisze „(...) komórki zostają poddane elektroporacji z wykorzystaniem specjalnych elektrod” i „Uzyskane wyniki potwierdziły bardzo dobre właściwości fizykochemiczne elektrod (...)” ale nie opisuje w czym ta „specjalność” się przejawia ani kiedy wyniki można uznać za „bardzo dobre”. Ogólne stwierdzenia, takie jak „bardzo poważny”, „bardzo częsty”, (strona 17) „wymagający mnóstwa czasu, wysiłku i zasobów pieniężnych” (przykład ze strony 27), „znaczny spadek żywotności” (przykład ze strony 34) powinny być zastąpione twardymi danymi (np. średni koszt wprowadzenia leku na rynek, procent pacjentów cierpiących na powikłania w danej metodzie leczenia, jakie konkretnie właściwości są kluczowe dla danego zastosowania, itd.). Inny przykład to opis „wzmocnienia hydrodynamicznego” w mikroukładach. Wskazano tylko, że mikrosystemy pozwalają na stworzenie „dogodnych warunków hydrodynamicznych mających na celu dodatkowo zwiększenie wydajności elektroporacji”. Nie wiadomo, kiedy warunki są „dogodne”. Rysunek 10 nie rozwiewa tych wątpliwości. Przedstawiona lista wskazuje przykłady i nie jest listą wyczerpującą. Podobnie mało precyzyjne opisy można odnaleźć również w rozdziałach, w których prezentowane są wyniki uzyskane w ramach pracy nad rozprawą.

Rysunek 9 nie pokazuje opisanych na stronie 39 czterech rodzajów elektrod. Opis tego rysunku

jest lakoniczny i nie ułatwia zrozumienie wad i zalet poszczególnych typów stosowanych układów.

Rozdziały 4, 5 i 6

Część doświadczalna rozprawy rozpoczyna się od opisu celu pracy (rozdział 4) i hipotez badawczych (rozdział 5). Rozdziały te są informatywne, mimo że krótkie. Rozdział 6 zatytułowany jest „Metodyka badawcza”. Opis odczynników i procedur zawiera kilka niedopowiedzeń:

- Nie jest jasne w jaki sposób w procedurze 6.6 („Elektroporacja sferoidów”) wykonano punkt 2 („Usunięcie medium hodowlanego”), skoro sferoidy hodowane były w płytkach hydrofobowych i nie były związane z powierzchnią. To samo dotyczy punktu 6 („Usunięcie roztworu Alamar Blue znad sferoidów”) w procedurze 6.10.
- Jak na wynik eksperymentów (np. w 6.4, punkt 4) wpływa różnica w ilości komórek między próbkami, a kontrolą (próbka to 180 ul zawiesiny + lek, kontrola to 200 ul zawiesiny)? 10% mniej komórek w próbkach w porównaniu do kontroli może powodować zmniejszenie sygnału analitycznego (najczęściej fluorescencji), które może być błędnie interpretowane np. jako spadek proliferacji komórek.
- Czy w opisanych protokołach lek rozpuszczony był w buforze czy w wodzie?
- Jak wykonano procedury opisane w punkcie 6.5, skoro „nie ma dostępnych komercyjnie tego typu urządzeń” (brakuje opisu wykorzystanej aparatury)?
- Czy płytki ITO były przygotowane w ramach pracy czy zakupione?
- Brak choćby pobieżnego opisu PBFi (np. jako „potassium-binding benzofuran isophthalate”).
- Brakuje adekwatnych opisów procedur oraz odczynników wykorzystanych w pracach dotyczących elektroporacji kropek kwantowych.

Detalem, którego zabrakło, jest brak krótkich opisów sposobu działania wykorzystanych sond fluorescencyjnych. Dla przykładu, w punkcie 6.14 wystarczyłoby dodać, informację, że Fluo-4 jest barwnikiem, którego fluorescencja (rośnie 100x w obecności jonów wapnia). Obecny jest krótki opis działania kalceiny, Alamar Blue, jodku propidyny, czy FluoVolt, ale nie MTT, DCFH-DA, Fluo-4, czy PBFi.

Rozdział 7

Mam wątpliwości czy odpowiednio zaznaczono wyniki, dla których wartość testu ANOVA były mniejsze niż 0.05 (czyli oznaczenie „gwiazdek” na wykresach). Dla przykładu na rysunku 16a zaznaczono, że różnica między próbką „K EP” (kontrola po elektroporacji) oraz próbką „38 uM 5-FU EP” (czyli elektroporacji w obecności 38 uM 5-fluorouracylu) jest statystycznie istotna. Brak natomiast odnotowanej różnicy między „K EP” (kontrola po elektroporacji) oraz próbką 192 uM 5-FU EP (czyli elektroporacji w obecności 192 uM 5-fluorouracylu), mimo że wyniki dla 38 uM i 192 uM 5-fluorouracylu po elektroporacji są do siebie bardzo zbliżone (a wręcz 192 uM działa lepiej (zgodnie z przewidywaniami) i różnica jest jeszcze większa). Analogiczny komentarz dotyczy również wyników ilości jonów wapnia w komórkach (rys. 24) oraz poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach (rys. 21).

Podnoszę ten problem, ponieważ w dyskusji wyników Doktorantka powinna uwzględnić przede wszystkim rezultaty po zastosowaniu elektroporacji i leku, dla których jednocześnie stwierdzono statystycznie istotne różnice w porównaniu do 1) samego leku, oraz 2) samej elektroporacji. Celem było przecież pokazanie, że jednoczesne działanie tych dwóch czynników jest skuteczną formą zwalczania raka.

Jeżeli wynik nie jest statystycznie różny od samego leku, to po co dodawać etap elektroporacji? Jeżeli wynik nie jest statystycznie różny od elektroporacji, to skąd wiadomo, że lek dostał się do środka komórki? W mojej opinii należy zweryfikować wszystkie wartości p-value oraz wskazać próby, w których wyniki „lek + elektroporacja” wykazuje statystycznie istotne różnice zarówno w porównaniu do „leku” jak i samej „elektroporacji”.

Sposób przedstawienia wyników w tym rozdziale wskazuje, że tylko 5-fluorouracyl w stężeniu 38 μM (ale nie w stężeniu wyższym, tj. 192 μM) w stosunku do komórek zarówno A375 jak i HaCaT, 1 μM OXA w stosunku do A375, oraz jony wapnia (2 mM) w stosunku do A375 i HaCaT działają lepiej w połączeniu z elektroporacją. Mam wątpliwości, czy tak było w rzeczywistości, czy może jednak na rysunkach nie zaznaczono wszystkich wyników analizy statystycznej (np. różnicy między „K EP” a „192 μM 5-FU EP”).

Doktorantka pisze również, że „w badaniach zastosowano dwie różne sole wapnia, co pozwoliło określić wpływ (...) przeciwjonu na żywotność komórek”. Nie opisano dlaczego wybrano te konkretne przeciwjony. Czy chodziło o ich mobilność elektroforetyczną? Napisano jedynie, że zauważono „liniowe zmniejszanie żywotności komórek” co nie jest prawdą w badanym zakresie badanych stężeń – zależność zdecydowanie nie jest liniowa.

Nie zgadzam się również ze stwierdzeniem, że „na podstawie otrzymanych wyników wybrano optymalne parametry elektroporacji”. Sprawdzono dwa zestawy parametrów – jeden wykorzystywany w testach *in vitro* (1 impuls, 10 ms), drugi w elektrochemioterapii (8 impulsów, 0.1 ms każdy). Już sam sumaryczny czas ekspozycji na pole elektryczne różni się o ponad rząd wielkości (10 ms vs 0.8 ms). Wybór między dwoma zestawami parametrów na pewno nie jest optymalizacją, która prowadziłaby do poznania „optymalnych” warunków eksperymentu.

Rozdział 8

Rozdział 8 zatytułowany jest „Elektroporacja komórek w postaci monowarstwy”. Wyniki zaprezentowane w tym rozdziale zostały częściowo opublikowane w publikacji *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 351, 130889. W artykule opisano 5-fluorouracyl oraz DOX, natomiast w rozprawie dodano wyniki dotyczące OXA oraz jonów wapnia.

Opracowano dwa moduły elektrodowe, które można umieścić w dołkach standardowej płytki 96 dołkowej. Wykonano symulacje numeryczne rozkładu natężenia pola elektrycznego dla obu modułów. Nie jest jasne czy wzięto pod uwagę czas tworzenia podwójnej warstwy elektrycznej, która skutecznie zmniejsza wartość przyłożonego potencjału na stosunkowo krótkim dystansie od powierzchni elektrody. Jaki byłby czas tworzenia podwójnej warstwy elektrycznej w badanym układzie? W rozprawie brakuje wyjaśnienia dlaczego w okolicy elektrody centralnej w module cylindrycznym natężenie pola elektrycznego osiąga wartości bliskie 2000 V/cm, jeżeli różnica potencjału pomiędzy elektrodami wynosi maksymalnie 200 V, a odległość między nimi 0.2 mm, co daje natężenie pola 1000 V/cm. Znany jest wzór analityczny, który opisuje natężenie pola elektrycznego w układzie koncentrycznych elektrod (równanie 9 w Parkinsons Dis. 2011:414682). Wzór ten przewiduje maksymalne wartości nawet na poziomie około 2500 V/cm w badanym układzie. Wyjaśnienie tej pozornej sprzeczności byłoby niezwykle pomocne, ponieważ różnica w skuteczności obu układów elektrodowych może wynikać wprost z faktu, że w układzie koncentrycznym pole elektryczne ma znacznie większe efektywne natężenie niż w układzie igłowym.

Na stronie 87 Doktorantka błędnie odwołuje się do rysunku 29 (powinien być 28). Sam rysunek 28 jest również błędnie opisany (zestawy parametrów (I) i (II) na rysunku są błędnie przypisane).



Czy czarny okrąg na zdjęciu na rysunku 29 (dla komórek HaCaT, 1000 V/cm, 1 impuls 10 ms, moduł cylindryczny) odpowiada obszarowi zwiększonego natężenia pola elektrycznego w symulacjach na rysunku 26f?

Nie jest jasne, dlaczego na rysunku 30 nie przedstawiono wyników dla natężenia pola elektrycznego 750 V/cm. Zgodnie z rysunkiem 28 tam również powinny być widoczne pory.

Na rysunkach 31 d, 34 b i d nie zaznaczono skali, a skala na rysunku 30 jest niezwykle trudna do odczytania.

W wielu miejscach w tym rozdziale Doktorantka twierdzi, jak np. na stronie 99, że „wyniki badań uzyskane dla monowarstw są zgodne z wynikami badań uzyskanymi dla zawieszin komórek”. Nie zgadzam się z taką analizą wyników. Dla zawiesziny wyniki wskazywały, że EP wzmacnia działanie 5-fluorouracylu w stężeniu 38 uM (ale nie w stężeniu wyższym, tj. 192 uM) w stosunku do komórek A375 jak i HaCaT, 1 uM OXA w stosunku do A375, oraz jonów wapnia (2 mM) w stosunku do A375 i HaCaT. Wyniki dla monowarstw pokazują skuteczne działania jedynie 5-fluorouracylu (w obu testowanych stężeniach w stosunku do A375 i HaCaT). Nie wiadomo dlaczego OXA i Ca²⁺ okazały się nieskuteczne w tym układzie.

Rozdział 9

Rozdział 9 rozprawy dotyczy elektroporacji sferoidów. Doktorantka nagminnie używa w tym rozdziale nieprecyzyjnych opisów typu „duża”, „mała”, „znacząca” itp.

Rysunki 47 i 52 są błędnie opisane i jakoby dotyczą komórek A375, natomiast opisy w tekście wskazują, że są to komórki HaCaT.

Doktorantka we wnioskach pisze, że „Wyniki badań dotyczące wykorzystania elektroporacji do wprowadzenia wybranych związków do sferoidów są w zgodzie z wynikami otrzymanymi w badaniach prowadzonych na zawieszinie komórkowej i monowarstwie” (strona 124). Biorąc pod uwagę duży rozrzut wyników pomiarów wielkości sferoidów (n=2), brak jednoznacznej metryki pozwalającej zmierzyć przeżywalność sferoidów i analizy zdjęć z mikroskopu (podano jedynie opis „dużo” – „mało”) trudno jest formułować wnioski na podstawie tych wyników.

Rozdział 10

W rozdziale 10 opisane są wyniki dotyczące elektroporacji komórek w mikroukładach. W pierwszym podejściu testowane były elektrody złote, jednak nie zapewniały wystarczającej biokompatybilności. Dlatego eksperymenty prowadzono z wykorzystaniem elektrod ITO. Zbadano trzy różne geometrie (opisane jako „elektrody proste”, „okrągłe” i „proste o zaokrąglonych końcach”).

Nie jest jasne czy w tym rozdziale „efektywność elektroporacji” (rys 65b) wyznaczona była tak samo jak we wcześniejszych rozdziałach. Jeżeli tak, jest to niezwykle zaskakujące. W rozdziale 10 wynosiła ona mniej niż 100% (rys 58, 65b, 67b, 70, 73), a w rozdziałach poprzednich (7, 8) była większa niż 100% (rys 14, rys 28). Czy oznacza to, że ilość barwnika, który wniknął bez elektroporacji była większa niż z elektroporacją? Byłoby to niezgodne z głównym założeniem pracy.

W rozprawie brakuje schematu układu dla elektrod prostych, podobnego do schematów dla pozostałych układów, tj. rys 69a oraz 72a.

Nie wiadomo dlaczego do ewaluacji efektywności leków w połączeniu z elektroporacją w mikroukładach nie wykorzystano testu MTT (żywności komórek), tak jak w poprzednich rozdziałach (7 i 8), a skupiono się na proliferacji (test Alamar Blue). Opis również nie pomaga w zrozumieniu tych badań,



ponieważ w podsumowaniu (rozdział 10.3, strona 155 oraz 156) Doktorantka pisze mimo wszystko o żywotności (np. „Porównując wyniki żywotności komórek po inkubacji i elektroporacji z lekami uzyskanymi w doświadczeniach wykonanych w makroskali (na trzech różnych modelach komórkowych) z wynikami otrzymanymi w mikroskali dochodzi się do niejednoznacznych wniosków”). Trudno mi było dojść do jakichkolwiek wniosków, ponieważ w rozprawie nie zaprezentowano wyników testów MTT (żywotność) w mikroukładach dla próbek wystawionych na elektroporację, lek, oraz lek i elektroporację jednocześnie.

Nie jest również jasne dlaczego badania nad zwiększeniem efektu leków w mikroukładach ograniczono tylko do jednej linii komórkowej (A375) zamiast dwóch (A375 i HaCaT) oraz tylko dwóch czynników o potencjale terapeutycznym (5-fluorouracyl, OXA) zamiast czterech jak w poprzednich rozdziałach (5-fluorouracyl, OXA, DOX i jony Ca^{2+}).

Rozdział 10.2.3.6 jest skrótem wyników opublikowanych w pracy *Bioelectrochemistry 126 (2019) 86–91*. Zaskakujące jest, że Doktorantka poświęciła im jedynie około 1 strony w całej rozprawie. Zamieszczony opis jest bardzo powierzchowny. Brakuje również odpowiednich opisów dotyczących materiałów i metod użytych w badaniach (rozdział 6 „Metodyka badawcza”). W rozprawie nie ma detali dotyczących przeprowadzenia tych eksperymentów.

Doktorantka opisuje wyniki pokazane w rozdziałach 10.2.3.3 (zmiany potencjału błonowego), 10.2.3.4 (ilość jonów wapnia w komórkach) oraz 10.2.3.5 (monitorowanie ilości jonów potasu), ale nie próbuje ich wyjaśniać oraz wiązać ich znaczenia z innymi wynikami opisanymi w rozprawie. Same dane również są trudne w interpretacji, ponieważ nie pokazano wyników dla próbek kontrolnych (czyli bez elektroporacji). Możliwe jest, że próbki zostały znormalizowane w stosunku do kontroli i pokazują procentową wartość w każdym punkcie czasowym. Nie wiadomo jak została wykonana analiza danych (rysunki 75, 76, 77). Sam opis tych wyników jest w wielu miejscach nieprecyzyjny. Dla przykładu na stronie 148 napisano „zauważono gwałtowny wzrost potencjału błonowego komórek zaraz po podaniu impulsu elektrycznego”. Wzrostu tego nie ma dla próbki „1000 V/cm”, a podobne zmiany (zarówno dodatnie jak i ujemne) obserwowane są przez cały czas trwania eksperymentu (we wszystkich próbkach), a nie tylko po zastosowaniu impulsu. Dodatkowo, sama zmiana fluorescencji wynosi maksymalnie około 3% (dla próbki 1200 V/cm). Nie wiadomo czy można to uznać za zmianę „gwałtowną” czy wynika to z procesów metabolicznych w komórkach. Inny przykład to opis wyników przedstawionych na rysunku 77: „Zaobserwowano prawie 5% zmniejszenie poziomu jonów potasu w komórce po 5 s od podania impulsu elektrycznego (...)”. Wydaje się mało prawdopodobne, że zmiana intensywności fluorescencji próbника jest równa, a nie proporcjonalna, do stężenia jonów potasu. Na wykresie widać zmianę intensywności fluorescencji próbника o 3% do 5%, ale ta fluorescencja pokazana jest w jednostkach arbitralnych i nie wiadomo jak przeliczyć ją na stężenie jonów.

Uwagi ogólne

Dostrzegłem również problemy z odnośnikami literaturowymi. Znaczna ich część (>10%) jest źle sformatowana (np. referencje 8 i 9 – brak czasopisma i DOI; referencja 10 brak roku i czasopisma; referencja 11 – brak autorów, roku, czasopisma; referencja 13 – brak czasopisma i DOI; referencja 34 - brak autorów, czasopisma, roku, DOI). Dostrzegłem problemy z formatowaniem referencji w 17 pozycjach na liście odnośników literaturowych.

W tekście zabrakło odniesień do referencji 114 i 115 (a przynajmniej te braki zauważyłem).

Odnosnik 115 pojawił się w podpisie pod rysunkiem 11, ale był tam wstawiony błędnie – powinno to być odniesienie do pracy 117.

W niektórych częściach rozprawy brakuje odnośników literaturowych. Dla przykładu w rozdziale 1.2.3. we fragmentach dotyczących działania bleomycyny oraz cisplatyny nie ma ani jednego odniesienia literaturowego. Porównanie działania tych leków z elektroporacją i bez wzmiankowane jest w referencjach 39 i 40 w tabeli 1, tym bardziej dziwi brak odnośników w tekście.

Również w pierwszej części rozdziału 10 brak jest odnośników literaturowych. Dla przykładu stwierdzenie „Złoto charakteryzuje się wysoką przewodnością (rezystywność $2,44 \cdot 10^{-8} \text{ ohm} \cdot \text{m}$), jest także nietoksyczne” (strona 126) powinno być opatrzone przypisem. Tym bardziej, że w tym przypadku złoto okazało się mieć negatywny wpływ na komórki (np. fragment: „stwierdzono negatywny wpływ materiału, z którego wykonane zostały elektrody na żywotność komórek” – strona 131).

Dużym problemem w odbiorze pracy jest jej formatowanie. Doktorantka wykazała bardzo swobodny stosunek do stosowania akapitów. Dla przykładu rozdział 1.1, który liczy trzy strony tekstu (bez dwóch linijek) jest jednym akapitem. Podobnie rozdział 2.4.3 (półtorej strony). W wielu miejscach dodany jest odstęp pomiędzy akapitami, ale brakują wcięć. Czytając nie wiadomo czy nowe zdanie dotyczy poprzedniego wątku, czy już zupełnie nowej myśli.

Odnalazłem stosunkowo niewielką ilość błędów stylistycznych i interpunkcyjnych. W kilku miejscach brak jest spacji między wartością i jednostką. Doktorantka używa również żargonu, np. pisząc o komórkach „przyklejonych”, które się „odkleja” od podłoża. Są to jednak drobiazgi.

Podsumowanie

Problem ze spójnością wyników zaprezentowanych w rozprawie dotyczy również wniosków końcowych (rozdział 11). Doktorantka pisze: „Podsumowując, uzyskane wyniki potwierdziły możliwość wykorzystania elektroporacji do wprowadzania 5-fluorouracylu, oksaliplatyny oraz chlorku wapnia do komórek (...). Nie zauważono podobnych zależności dla doksorubicyny. Należy zwrócić uwagę na fakt, że potencjał wykorzystania EP do wprowadzenia wymienionych związków potwierdzono na trzech modelach komórkowych: zawiesinie komórkowej, monowarstwie oraz sferoidach”. Jednak analizując zamieszczone w rozprawie wyniki, nawet pomijając problem ich powtarzalności, okazuje się, że w przypadku zawiesiny (rozdział 7) tylko 5-fluorouracyl w stężeniu 38 μM (ale nie w stężeniu wyższym 192 μM) w stosunku do komórek zarówno A375 jak i HaCaT, 1 μM OXA w stosunku do A375, oraz jony wapnia (2 mM) w stosunku do A375 i HaCaT działają statystycznie lepiej niż sam lek oraz sama elektroporacja. W przypadku monowarstw (rozdział 8) pokazano skuteczne działanie tylko 5-fluorouracylu (w obu testowanych stężeniach w stosunku do A375 i HaCaT). Nie wiadomo dlaczego OXA i Ca^{2+} okazały się nieskuteczne w tym układzie. Analiza wyników uzyskanych dla sferoidów nie ujawniła żadnego przypadku, w którym pokazano by, że istnieje istotna statystycznie różnica między próbkami, które poddane były działaniu jednocześnie leku i elektroporacji w porównaniu z samym lekiem i samą elektroporacją. Wydaje się, że wynik badania proliferacji w przypadku testowaniu 5-fluorouracylu na stronie 106 (rysunek 39) oraz OXA na stronie 117 (rysunek 48) powinny spełniać ten warunek. W rozdziale 10 (mikroukłady) zbadano tylko 5-fluorouracyl i OXA (a DOX i jony wapnia nie), ale nie pokazano danych dotyczących żywotności komórek. Podsumowując, trudno uznać, że „potencjał wykorzystania EP do wprowadzenia wymienionych związków [tj. 5-fluorouracylu, oksaliplatyny oraz chlorku wapnia – dop. JP] potwierdzono na trzech modelach komórkowych: zawiesinie komórkowej, monowarstwie oraz sferoidach” skoro dla zawiesin

działa 5-fluorouracyl, OXA i jony wapnia, w przypadku monowarstw tylko 5-fluorouracyl, a dla sferoidów potencjalnie 5-fluorouracyl i OXA. Być może błąd wynika tylko z reprezentacji wyników na wykresach, ale wątpliwości te muszą zostać rozwiane w czasie obrony.

Podsumowując, w czasie obrony Doktorantka powinna przede wszystkim odnieść się do wątpliwości związanych z

- różnicami w wynikach uzyskanych dla identycznych próbek (przede wszystkim próbek kontrolnych poddanych działaniu tylko elektroporacji) w badaniach dotyczących zawiesin, monowarstw oraz sferoidów,
- analizą statystyczną uzyskanych wyników (i zaznaczeniem na wykresach wartości pomiędzy którymi występują statystycznie istotne różnice),
- analizą i podsumowanie uzyskanych wyników,
- brakiem opisów dotyczących wyników wprowadzania kropek kwantowych do komórek,
- brakiem opisu mechanizmu zjawiska elektroporacji.

Pomimo dużej ilości uwag i pytań oceniam, że rozprawa doktorska mgr inż. Sandry Skorupskiej „Badania nad wykorzystaniem elektroporacji do kontrolowanego wprowadzania cząsteczek leków do komórek” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, szczególnie w częściach wcześniej opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych. Dlatego stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 roku, poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 roku, poz. 1669). W związku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej wniosek o dopuszczenie mgr inż. Sandry Skorupskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

