

Poznań, 28.05.2018

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr Anny Szewczyk** pt.:  
"Modulacja odpowiedzi komórkowej w liniach komórek mięśniowych i nowotworowych  
inicjowana elektroporacją w obecności jonów wapnia"

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa na stopień doktora nauk biologicznych Pani mgr Anny Szewczyk pt. "Modulacja odpowiedzi komórkowej w liniach komórek mięśniowych i nowotworowych inicjowana elektroporacją w obecności jonów wapnia", wykonana pod kierunkiem promotora dr hab. Małgorzaty Daczewskiej i promotora pomocniczego dr hab. inż. Julity Kulbackiej, powstała w oparciu o cykl dwóch, powiązanych ze sobą tematycznie artykułów o łącznym IF = 8,581:

1. Zielichowska A, Daczewska M, Saczko J, Michel O, Kulbacka J. Applications of calcium electroporation to effective apoptosis induction in fibrosarcoma cells and stimulation of normal muscle cells. *Bioelectrochemistry*. 2016 Jun;109:70-8.  
IF 3,413; 35.000 Pkt. MNiSW/KBN
2. Szewczyk A, Gehl J, Daczewska M, Saczko J, Frandsen SK, Kulbacka J. Calcium electroporation for treatment of sarcoma in preclinical studies. *Oncotarget*. 2018 Jan 30;9(14):11604-11618.  
IF: 5.168, 35.000 Pkt. MNiSW/KBN

W/w publikacje przeszły procedurę recenzji zgodnie z wymogami redakcji *Bioelectrochemistry* oraz *Oncotarget*. Uważam, że już sama wysoka ranga obu czasopism stanowi wystarczającą rekomendację i świadczy o dużej wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej. W obu artykułach Doktorantka jest pierwszym autorem. Dysertacja posiada zwartą, proporcjonalną budowę, zgodną z obowiązującymi kanonami dla pracy doktorskiej i zawiera:

- ciekawie i klarownie zredagowane **streszczenie**,
- jednoznacznie i przejrzysto sformułowane **cele pracy**,
- **wstęp** sygnalizujący problematykę przedstawioną w pracy, który bardzo dobrze wprowadza czytelnika w cykl opublikowanych przez Doktorantkę artykułów,
- **oryginały dwóch** składających się na dorobek Doktorantki **publikacji**,
- **podsumowanie i wnioski**,
- **piśmiennictwo** obejmujące 95 pozycji,
- oraz **wykaz dorobku naukowego** Doktorantki.

Temat rozprawy związany jest z jednym z najbardziej aktualnych zagadnień dotyczących leczenia nowotworów, a mianowicie: ze zwiększeniem skuteczności terapeutycznej i ograniczeniem działań niepożądanych stosowanych terapii. Aplikacja wielu leków stosowanych w chemioterapii nowotworów, ze względu na brak ich swoistości oraz słabą farmakokinetykę prowadzi do ogólnoustrojowej toksyczności. Dlatego wiele uwagi poświęca się obecnie rozwojowi metod pozwalających na bezpośrednie wprowadzenie cytostatyków do komórek nowotworowych. Jedną z takich metod jest elektrochemioterapia (ECT), która polega na miejscowym działaniu zmiennego prądu elektrycznego w celu przejściowego i odwracalnego zaburzenia przepuszczalności błon komórkowych. Bezpośrednim efektem zastosowania tej metody jest pojawienie się, obok wyspecjalizowanych przenośników w błonie, również dodatkowych szlaków w postaci elektroporów, umożliwiających swobodny transport makrocząsteczek, które w normalnych warunkach słabo przenikają przez błony komórkowe.

Doktorantka Pani mgr Anna Szewczyk podjęła się próby integracji elektroporacji (EP) z jonami wapnia (CaEP) w kontekście terapii antynowotworowej oraz określenia efektywności tej terapii na modelach badawczych *in vitro* oraz *in vivo*, co doskonale wpisuje się w ten ważny nurt naukowy. Tematykę tę postrzegam jako wysoce oryginalną, w literaturze jest bowiem aktualnie dostępny zaledwie wąski wachlarz publikacji z tego zakresu, z których większość ukazała się w ostatnich kilku latach.

Z obowiązku Recenzenta chciałabym jednak zasygnalizować kilka kwestii, które mają na celu dalsze doskonalenie warsztatu badawczego Doktorantki:

1. Współautorzy publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej powinni umieścić oświadczenie, o tym jaki był rzeczywisty wkład Doktorantki w wykonanie poszczególnych zadań badawczych, ułatwiłoby to bowiem ocenę pracy.

2. We „Wstępie” zabrakło mi większej liczby cytowań pozycji literaturowych, np. w rozdziale 4.2. *Gospodarka wapniowa w komórkach mięśniowych*, Autorka rozprawy zaledwie dwa zdania podparła odnośnikami literaturowymi.

3. Publikacja: *Applications of calcium electroporation to effective apoptosis induction in fibrosarcoma cells and stimulation of normal muscle cells*.

Praca w ciekawy sposób pokazuje w jaki sposób modulacja stężenia jonów wapnia wywołana elektroporacją powoduje śmierć komórek nowotworowych, stymulując jednocześnie komórki prawidłowe do zwiększonej proliferacji. W pracy tej pojawia się jednak kilka niedociągnięć w części dotyczącej metodyki. Brakuje między innymi informacji o ilości powtórzeń każdego eksperymentu oraz w jaki sposób przedstawione zostały zmienne statystyczne (np. w przypadku Fig. 1 nie wiadomo czy słupki błędów przedstawione są jako średnia  $\pm$  SD lub SEM). Brakuje również informacji przy jakich parametrach zostały zebrane obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego oraz konfokalnego. Na Fig. 4 i Fig. 5 nieczytelne jest powiększenie przy jakim obrazy zostały wykonane. Być może wynika to jednak ze słabej

kopi publikacji, która została dołączona.

#### 4. Publikacja: *Calcium electroporation for treatment of sarcoma in preclinical studies*.

W tej publikacji autorzy dokonali oceny efektywności CaEP wykorzystując do tego celu komórki linii prawidłowych i nowotworowych (niezróżnicowane oraz zróżnicowane). Założenie polegające na wykorzystaniu w eksperymencie zróżnicowanych komórek mięśniowych miało kluczowe znaczenie, bowiem to właśnie komórki zróżnicowane odzwierciedlają w pełni warunki żywego organizmu. Doktorantka oraz współautorzy publikacji dokonali rzeczowej oceny otrzymanych wyników, jak również ich omówienia w dojrzałej i twórczej dyskusji.

Protokoły eksperymentalne zostały przygotowane w sposób czytelny, choć podobnie jak w przypadku wcześniejszej publikacji, w metodyce pojawia się kilka niedociągnięć wymagających dopracowania. W przypadku wyników z Western blotu, wskazane byłoby wyjaśnienie dlaczego ekspresja PMCA normalizowana była do markera egzogenego. Prawidłowa normalizacja polega na stosowaniu wewnętrznej kontroli procesu, z zastosowaniem endogenego białka jako wskaźnika stężenia próbki. Ponadto, wyjaśnienia wymaga opis badań *in vivo*. Pojawia się pytanie, czy każda z grup eksperymentalnych zawierała  $n = 10$  zwierząt, czy liczba ta dotyczyła czterech badanych grup? Odpowiedź na to pytanie pozwoliłaby może zrozumieć brak różnic statystycznych pomiędzy grupami. Co więcej, biorąc pod uwagę fakt, iż układ immunologiczny odgrywa znaczącą rolę w odpowiedzi na CaEP, na co również zwracają uwagę autorzy, może warto było rozważyć wykorzystanie w eksperymencie mysich modeli mięsaków. Cennym rozwinięciem eksperymentu *in vivo* byłoby również zbadanie materiału tkanki guza pobranego po zakończeniu badania w celu oceny mechanizmów związanych z brakiem odpowiedzi na testowaną terapię.

W podsumowaniu stwierdzam, iż Doktorantka w przedstawionej mi do recenzji dysertacji wykazała się wysoką umiejętnością prowadzenia badań naukowych, właściwym doбором metod badawczych oraz umiejętnością wyciągania wniosków z uzyskanych wyników.

Warto przy tym podkreślić, że nowatorski charakter badań oraz ich wysoka jakość znalazły uznanie także w oczach Recenzentów dwóch czasopism o randzie międzynarodowej, w których wyniki prezentowanych badań zostały opublikowane. Poczynione przeze mnie uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy i nie rzutują na jej bardzo wysoką ocenę.

Dlatego z pełnym przekonaniem uważam, że oceniana rozprawa spełnia warunki stawiane pracom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie Pani **mgr Anny Szewczyk** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uważam ponadto, że ze względu na dorobek naukowy płynący z wyników dysertacji, dojrzały warsztat badawczy oraz duży nakład pracy, który Doktorantka włożyła w jej wykonanie, zasługuje ona na wyróżnienie.

**Gabriela Kramer-Marek, Dr hab.**

Kierownik Grupy Obrazowania Przedklinicznego

