

Łódź 11.08.2022

Prof. dr hab.n. med. Marlena Broncel
Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej,
Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Kniaziewicza 1/5, 91-347 Łódź
tel/fax 42 251 60 03, tel. 607698372
e-mail:marlena.broncel@umed.Łodz.pl

OCENA
rozprawy doktorskiej Kamili Białkowskiej
zatytułowanej: „Opracowanie i wdrożenie metod badawczych do oceny wpływu
materiałów na komórki hodowane w hodowlach 3D, na przykładzie wykorzystania
dendrymerów jako nośnika siRNA”
promotor - dr hab. Katarzyna Miłowska, prof. UŁ
promotor pomocniczy: dr inż. Piotr Komorowski

Praca Pani magister Kamili Białkowskiej podejmuje dwa ważne tematy dotyczące metodologii hodowli komórkowych w warunkach 2D i 3D oraz zastosowania karbokrzemowych dendrymerów (CBD-1, CBD-2) jako transporterów siRNA.

Hodowle komórkowe są powszechnym narzędziem służącym określeniu aktywności biologicznej nowych związków o potencjale leczniczym. Pomimo swojej długiej historii i zaawansowania technicznego, hodowle komórkowe w dwuwymiarowym środowisku (2D) nie są wolne od wad. System 2D hodowli komórek, znacząco odbiega od ich fizjologicznego środowiska. Powoduje to, że komórki wystawione na działanie związków chemicznych, zachowują się inaczej niż w sytuacji, gdy znajdują się w macierzystym organizmie. Różnice widoczne są przede wszystkim w ekspresji genów, a co za tym idzie białek receptorowych, sygnałnych. Hodowle trójwymiarowe (3D) lepiej odzwierciedlają warunki in vivo i mogą stać się powszechnie używanym narzędziem w przesiewowych testach służących określeniu potencjału nowych związków farmaceutycznych. Z punktu widzenia farmakoekonomicznego tego typu hodowle mogą obniżyć koszty poszukiwania leków, dzięki dokładnemu oszacowaniu aktywności i toksyczności-substancji na wczesnym, przedklinicznym etapie badań.

Terapia genowa polega na wprowadzeniu do komórek pacjenta genu odpowiedzialnego za syntezę białka, którego niedobór lub brak są przyczyną choroby. Odkrycie zjawiska wyciszania genów za pośrednictwem siRNA stanowi przełom w leczeniu wielu chorób, w tym nowotworowych. Jednym z podstawowych problemów tej terapii jest efektywne wprowadzenie materiału genetycznego do komórki. Błona komórkowa jest silną barierą dla genów w postaci wielkocząsteczkowych kwasów nukleinowych o ujemnych ładunkach. Obiecujące wydają się dendrymery, syntetyczne polimery o niskim stopniu toksyczności.

Zatem zagadnienia poruszane przez Doktorantkę mają istotne znaczenie aplikacyjne dla przedklinicznych badań w zakresie terapii genowej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 91 stron, zawiera wykaz dorobku naukowego, wstęp, cele pracy, opis zastosowanych metod, omówienie prac wchodzących w zakres dysertacji i ich wydruki, podsumowanie, wniosek, streszczenie w języku polskim i angielskim, bibliografia (30 pozycji, wymienionych w porządku alfabetycznym) oraz oświadczenia współautorów z ich procentowym udziałem.

Rozprawa doktorska została przygotowana na podstawie 3 monotematycznych prac (w tym 2 oryginalnych, 1 przeglądowej) opublikowanych w wysoko indeksowanych czasopismach naukowych:

1. Białkowska K, Miłowska K, Michlewska S, Sokołowska P, Komorowski P, Lozano-Cruz T, Gomez-Ramirez R, de la Mata FJ, Bryszewska M. ***Interaction of Cationic Carbosilane Dendrimers and Their siRNA Complexes with MCF-7 Cells.***
Int J Mol Sci 2021;22 (13):7097. **IF-5,924; MEiN 140**
2. Białkowska K, Komorowski P, Gomez-Ramirez R, de la Mata FJ, Bryszewska M, Miłowska K. ***Interaction of Cationic Carbosilane Dendrimers and Their siRNA Complexes with MCF-7 cells Cultured in 3D Spheroids.***
Cells 2022; 11: 1697. **IF-6,600; MEiN-140**
3. Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K. ***Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures- Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application.***
Int J Mol Sci 2020; 21(17):6225; **IF=5,924; MEiN 140**

Warto podkreślić, że dwie prace oryginalne powstały we współpracy z ośrodkiem zagranicznym z Katedrą Chemii Organicznej i Nieorganicznej Uniwersytetu Alcalá w Hiszpanii. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, korespondencyjnym i jej wkład wynosi ponad 50%.

Ponadto dysertacja zawiera szczegółowe omówienie optymalizacji warunków hodowli 3D w postaci sferoidów.

We wstępie Autorka porównuje hodowle komórkowe prowadzoną w warunkach 2D i 3D. W sposób niezwykle syntetyczny przedstawia zasadnicze różnice i wskazuje na zalety hodowli 3D, podkreślając znaczenie praktyczne hodowli w postaci sferoidów w badaniach nad guzami litymi. Wyjaśnia podstawy terapii genowej opartej na wyciszaniu genów za pośrednictwem siRNA.

Cele pracy zostały jasno określone. Cel wdrożeniowy obejmował opracowanie i optymalizację metody hodowli komórek w postaci sferoidów, metod pozwalających na pomiary wpływu substancji na komórki hodowane w 3D i ostatecznie wdrożenie hodowli 3D do oferty usług Bionanoparku Sp. zo.o. w Łodzi.

Cel badawczy dotyczył porównania zdolności dwóch dendrymerów CBD-1 i CBD-2 do tworzenia kompleksów z siRNA i transportowania ich do komórek oraz oceny toksyczności tychże dendrymerów i ich kompleksów z siRNA w odniesieniu do komórek linii MCF-7 (komórek raka piersi).

Hipoteza badawcza zakładała, że dendrymery będą transportować siRNA (Mcl1 i Bcl2) do wnętrza komórek MCF-7 hodowanych zarówno w warunkach 3D (w formie sferoidów) jak i 2D. Założono, że skutkiem działania dendrypleksów będzie śmierć komórek nowotworowych.

Do potwierdzenia tworzenia się kompleksów pomiędzy dendrymerami i siRNA wykonano pomiary potencjału zeta, dichroizmu kołowego, fluorescencyjne z bromkiem etydydy oraz przeprowadzono elektroforezę kompleksów w żelu agarazowym (CBD2/siRNA). Ocenę wpływu dendrymerów i ich kompleksów z siRNA dokonano za pomocą testów XTT i live-dead. Zbadano również transport dendrypleksów do komórek wykorzystując mikroskop konfokalny oraz mikroskop automatyczny INCell Analyzer 2000 z analizą HCA.

W pracy „*Interaction of cationic carboxilane dendrimers and their siRNA complexes with MCF-7 cells*” Autorka wykazała, że każdy z badanych dendrymerów CBD-1 i CBD-2 tworzy kompleksy zarówno z siRNA Mcl-1 jak i siRNA Bcl-2. Doświadczenia zostały przeprowadzone w hodowlach 2D. Dodatkowo za pośrednictwem badania elektroforetycznego udowodniła ochronne właściwości dendrymerów wobec siRNA w obecności RNazy. Wyniki testu XTT wskazywały, że wpływ dendrymerów na komórki nowotworowe zależy od ich stężenia i rodzaju. Co ciekawe CBD-1 okazał się bardziej toksyczny w stosunku do komórek linii MCF-7 hodowanych w warunkach 2D niż CBD2. Przyłączenie zaś siRNA powodowało silniejszy efekt cytotoksyczny. Ze względu na większą cytotoksyczność CBD-1, do dalszej analizy ilościowej wykorzystano kompleksy CBD2/siRNA. Wykazano, że ok. 40% komórek

miało w swojej cytoplazmie kompleksy CBD-2/Mcl-1 i około 60% komórek posiadało kompleksy CBD-2/Bcl-2.

W drugiej pracy oryginalnej „*Interaction of Cationic Carbosilane Dendrimers and their siRNA complexes with MCF-7 cells cultured in 3D spheroids*” Autorka zajęła się oceną wpływu dendrymerów i dendrypleksów na komórki raka piersi w hodowli 3D w postaci sferoidów. Zaskakującym okazał się wynik dotyczący większej cytotoksyczności CBD2 w hodowli 3D niż CBD1, przeciwny do wyniku uzyskanego w hodowli 2D. Do dalszych badań wybrano takie stężenia dendrymerów, które nie były toksyczne dla komórek, czyli 5 i 10 uM. W testach live-dead po 24-godzinnej inkubacji z dendrypleksami istotne obniżenie liczby żywych komórek odnotowano dla dendrypleksów: CBD-1/Bcl-2, CBD-2/Mcl-1, CBD-2-Bcl-2 ale tylko w stężeniu 10 uM. Należy jednak podkreślić, że liczba żywych komórek nadal utrzymywała się na wysokim poziomie powyżej 90% i wydłużenie czasu inkubacji do 48 h nie miało większego znaczenie. Doktorantka zaprojektowała dodatkowy eksperyment, w którym podano 3 dawki dendrypleksów w odstępach 48-godzinnych. Najwyższy spadek komórek żywych odnotowano dla CBD-1/Mcl-1 i CBD-1/Bcl-2. Przenikanie dendrypleksów w hodowli 3D do wnętrza komórek okazało się znacznie mniejsze niż w hodowli 2D. Wyniki analizy cytometrycznej wskazywały, że zaledwie 8% komórek posiadało w swojej cytoplazmie dendrypleksy.

W trzeciej pracy przeglądowej „*Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures- Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application*” Autorka w świetny sposób opisała różnice pomiędzy hodowlami 2D i 3D. Praca była bardzo dobrze zaplanowana, w oparciu o najnowsze piśmiennictwo. Została podzielona na dwie części. W pierwszej dokonano dokładnego opisu mechanizmu tworzenia się sferoidów, druga zaś poświęcona została zastosowaniu hodowli komórek 3D w badaniach nad lekami przeciwnowotworowymi takimi jak: 5-FLU, oksaliplatyna, gefitinib oraz nanocząsteczkami jako transporterami leków. Niezwykle interesujące było omówienie zastosowania tego rodzaju hodowli w badaniach chorób neurodegeneracyjnych: Alzheimer i Parkinsona.

Uzyskane wyniki omówiono w formie dyskusji w poszczególnych 2 publikacjach oryginalnych. Doktorantka umiejętnie skomentowała wyniki swoich badań w stosunku do danych z piśmiennictwa, podkreślając istotne różnice pomiędzy badanymi dendrymerami CBD-1 i CBD-2. Zaakcentowała znaczenie rodzaju prowadzonej hodowli w ocenie cytotoksyczności dendrymerów i ich kompleksów z siRNA. Stopień cytotoksyczności nie tylko zależy od rodzaju dendrymeru, jego stężenia, czasu inkubacji ale także od warunków prowadzonej hodowli (2D, 3D).

Zwieńczeniem pracy doktorskiej jest jeden wniosek o dużym znaczeniu praktycznym, wynika on z założeń pracy i stanowi odpowiedź na sformułowaną wcześniej hipotezę badawczą.

Oceniana praca jest oryginalnym opracowaniem naukowym. Wartość poznawcza badań jest duża. Wszystkie prace przeszły przez gęste sito recenzji w redakcjach czasopism o zasięgu międzynarodowym, stąd brak moich uwag krytycznych.

W oparciu o powyższą opinię stwierdzam, że rozprawa doktorska „Opracowanie i wdrożenie metod badawczych do oceny wpływu materiałów na komórki hodowane w hodowlach 3D, na przykładzie wykorzystania dendrymerów jako nośnika siRNA” spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1, ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz.U. z 2003 Nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

Ze względu na nowatorskość opracowań, istotny aspekt praktyczny, realizację celu wdrożeniowego przeprowadzonych badań, współpracę międzynarodową oraz fakt opublikowania wszystkich prac w czasopismach posiadających wysoki IF (łącznie IF 18,448, MEiN-420) wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab.n.med. Marlena Broncel

Marlena Broncel

prof. dr hab. n. med. Marlena Broncel
specjalista chorób wewnętrznych
i farmakologii klinicznej
5767452