

Gliwice, dn. 31.01.2019

Dr hab. Monika Pietrowska
Centrum Onkologii – Instytut
im. Marii Skłodowskiej – Curie
oddział w Gliwicach
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15
44-100 Gliwice
tel. (32) 278 96 27
e-mail: monika.pietrowska@io.gliwice.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr Liliany Moniki Czernek** zatytułowanej „Badanie roli egzosomów pochodzenia nowotworowego w komunikacji międzykomórkowej” wykonanej w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy charakterystyki egzosomów trzech linii komórek nowotworowych tj. dwóch linii czerniaka (A375 i 1205Lu) oraz linii raka jajnika (OvC16), analiz interakcji egzosomów uwalnianych przez komórki nowotworowe z komórkami układu immunologicznego, a także wykorzystania potencjału egzosomów jako nośnika leków. Charakterystyka modelu badawczego obejmowała: (i) optymalizację metody izolacji, (ii) weryfikację obecności egzosomów technikami obrazowymi (AFM oraz TEM) oraz immunologicznymi (Western blot i cytometria przepływowa), (iii) ocenę warunków hodowli komórkowej w kontekście izolowanych egzosomów oraz (iv) zbadanie wpływu procedur przechowywania na stan egzosomów. W związku z tym, że w badaniach nad egzosomami nie istnieje „złoty standard” postępowania, to etap charakterystyki i optymalizacji procedury izolacji jest konieczny w każdej pracy badawczej w tej dziedzinie. Doktorantka zdecydowała się na izolację egzosomów za pomocą ultrawirowania, będącego jedną z kilku standardowych metod. Doktorantka zadbała, aby obecność egzosomów potwierdzić kilkoma niezależnymi testami. W mojej opinii ten etap pracy doktorskiej został bardzo poprawnie i w pełni zrealizowany. Jediną uwagę jaką można mieć na tym etapie to zastosowanie odwirowanej bydlęcej surowicy do suplementowania pożywki hodowlanej. Surowica bydlęca sama będąc źródłem egzosomów, co słusznie stwierdza doktorantka, jest niestety powodem kontaminacji egzosomów otrzymywanych w procesie ich izolacji z pożywek stosowanych w czasie hodowli komórkowej. W celu usunięcia egzosomów bydlęcych z surowicy używanej do suplementacji pożywki hodowlanej doktorantka wykorzystwała technikę ultrawirowania, niestety nie udokumentowała w swojej pracy oceny wydajności tego procesu.

Tematem pracy jest badanie roli egzosomów uwalnianych przez komórki nowotworowe w komunikacji międzykomórkowej. Doktorantka wybrała jako model tych oddziaływań komórki układu immunologicznego. Tematyka pracy badawczej, której podjęła się mgr Liliana Czernek jest bardzo aktualna, ale nie łatwa ze względu na ogromne zainteresowanie tematem dostarczające olbrzymią ilość często sprzecznych informacji. Dodatkowo, różnorodność technik izolacji i procedur wykorzystywanych w różnych laboratoriach powoduje trudności w odnoszeniu wyników swoich badań do wyników opisanych w pracach innych Zespołów. Fakt ten niezwykle utrudnia proces interpretacji wyników. Aby z powodzeniem prowadzić badania nad komunikacją międzykomórkową odbywającą się za pomocą egzosomów konieczna jest możliwość zobrazowania procesu wychwytu egzosomów przez komórki z wykorzystaniem technik mikroskopowych. Ze względu na rozmiar badanych struktur (około 100 nm) nie jest to zadanie trywialne. W prezentowanej pracy doktorskiej był to kolejny etap prowadzonych badań. Doktorantka zaprezentowała przegląd klas barwników fluorescencyjnych stosowanych dotychczas w badaniach nad egzosomami. Do badań własnych wybrała jednak dwa barwniki fluorescencyjne nie używane dotychczas do znakowania fluorescencyjnego egzosomów tj. ester sukcyimidynowy karboksylfluoresceiny (CFSE) oraz 4,4'-bis (4'- (N,N-bis (6''-(N,N,N-trimetyloamoniowy)-heksylo)-styrylo)-tetilodisililen (DSSN+). Opracowana przez mgr Lilię Czernek metoda wizualizacji egzosomów z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych została przez nią z powodzeniem wykorzystana w następnych etapach badań. W tej części pracy doktorskiej pojawiło się kilka niedociągnięć wymagających poprawienia dla ułatwienia interpretacji otrzymanych wyników: (i) na rycinie prezentującej kinetykę pobierania przez komórki znakowanych egzosomów (CFSE oraz DSSN+) brak zdjęć kontroli negatywnej; (ii) na rycinach (16B, 25, 26C, 27C) nie oznaczono istotności statystycznej porównywanych wartości, co utrudnia ocenę wagi otrzymanych wyników; (iii) z kolei na przykład rycina 28 nie zawiera odchyień standardowych. Na tym etapie badań została wykonana analiza potwierdzająca, że znakowane egzosomy pochodzące z tej samej linii komórkowej są pobierane z podobną intensywnością co egzosomy izolowane z innych linii komórkowych. Niestety, rycina 22 w swoim opisie nie zawiera informacji po jakim czasie dokonano tej analizy. Mimo tych technicznych uwag optymalizacja procesu wychwytu egzosomów przez komórki nowotworowe była podstawą do ciekawych badań komunikacji międzykomórkowej. Doktorantka wykazała, że status zróżnicowania komórek mieloidalnych wpływa na efektywność wychwytu egzosomów oraz „stosunkowo” (niestety brak oceny istotności statystycznej) wysoką ekspresję antygenu CD47 na egzosomach uwalnianych przez komórki nowotworowe, przy jednoczesnym wysokim wychwycie egzosomów uwalnianych przez te komórki przez makrofagi. Obecność CD47 na powierzchni egzosomów powinna blokować receptor SIRP α na powierzchni makrofagów i nie pozwalać na ich fagocytozę. Większość guzów nowotworowych chroni się przed atakiem makrofagów przez ekspresję białka CD47. Ten bardzo ciekawy wynik nie został poddany w mojej opinii wyczerpującej ocenie w przeprowadzonej przez autorkę dyskusji.

Z wykorzystaniem technik „transwell”, Western blot oraz cytometrii przepływowej doktorantka sprawdziła czy egzosomy pochodzące z komórek nowotworowych modyfikują szlaki sygnałowe odpowiedzi immunologicznej komórek biorców i wykazała zmniejszoną ekspresję receptora prezentującego antygen HLA-DR. Wynik ten stanowić może wstęp do wykonania badań funkcjonalnych badających zaobserwowaną zależność. Doktorantka wykonała ocenę poziomu białka NFAT5 (czynnik jądrowy aktywowanych limfocytów T) i wykazała wpływ podanych egzosomów na poziom białka NFAT5 w badanych liniach komórkowych. Wyniki wykazały dodatkowo obniżenie poziomu interleukiny 12 komórek układu immunologicznego po ekspozycji na egzosomy.

Prezentując wyniki analizy miRNA egzosomów w warunkach normoksji (21% O₂) i hipoksji (1% O₂) technikami mikromacierzy (microARRAY) doktorantka z powodzeniem wykorzystwała dostępne online oprogramowanie i samodzielnie przeprowadziła analizy statystyczne. Brak jednak informacji na temat wersji baz danych, z których doktorantka korzystała podczas wykorzystania tych narzędzi. Tabela 6 w tym rozdziale jest nieczytelna.

Kolejnym zagadnieniem podjętym przez doktorantkę była ocena potencjału egzosomów jako środków terapeutycznych. Doktorantka analizowała skuteczność metod „ładowania” potencjalnych leków do egzosomów. W tej części pracy doktorantka wykazała największą skuteczność elektroporacji. Analizy z wykorzystaniem testu MTT wykonane na egzosomach, do których wprowadzono związki będące potencjalnymi lekami powodowały podobny efekt cytotoksyczny jak bezpośrednie podanie tego związku w stężeniu powyżej 100 µM. Dotychczas w literaturze wykazano użyteczność egzosomów jako nośników leków. Praca wykonana przez doktorantkę potwierdza więc takie możliwości wykorzystania egzosomów. Ten element prezentowanej do oceny pracy doktorskiej jest najmniej spójny z pozostałymi badaniami, sama doktorantka również nie poświęca swojej decyzji ani słowa wyjaśnienia. We wstępie zabrakło w mojej opinii omówienia obecnego stanu badań, w którym doktorantka mogłaby przybliżyć czytelnikowi powody swojej decyzji wyboru tego kierunku badań.

Podsumowując ocenę tematyki badań i jej realizacji przez doktorantkę, przedstawioną do recenzji pracę oceniam wysoko. Mimo że nie zabrakło w zaprezentowaniu wyników badań potknięć, to badania będące jej przedmiotem mają charakter nowatorskich, zostały bardzo dobrze zaplanowane i zrealizowane.

Pod względem redakcyjnym pracę doktorską rozpoczyna szczegółowy wykaz skrótów oraz jej streszczenia w języku polskim i angielskim. Rozprawa doktorska została zredagowana w języku angielskim i obejmuje 184 strony tekstu wliczając w to między innymi bardzo obszerny przegląd literatury (bibliografię stanowi 518 pozycji). Układ pracy jest typowy. Zawiera standardowe dla tego typu dzieł naukowych rozdziały tj. wstęp, wyniki oraz dyskusję, metodykę badawczą, podsumowanie oraz bibliografię (w wymienionej kolejności). Wstęp pracy doktorskiej stanowi 30 stron (zawierających poza tekstem 4 ryciny oraz 2 tabele) starannie omawiające aktualny stan wiedzy związany

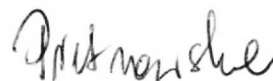
z prowadzonymi przez doktorantkę badaniami naukowymi. Poszczególne podrozdziały tej części są napisane z dużą znajomością tematu. Doktorantka skupia się na roli egzosomów w komunikacji międzykomórkowej, ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływań egzosomów uwalnianych przez komórki nowotworowe z komórkami układu immunologicznego stanowiących przedmiot jej badań. W mojej opinii zabrakło w tej części wprowadzenia do prezentowanych w dalszej części badań nad wykorzystaniem egzosomów jako nośnika leków. Ta dziedzina badań nad egzosomami jest dobrze udokumentowana w literaturze i jest niewątpliwie jedną z intensywniej badanych funkcji egzosomów. Kolejny rozdział pracy stanowi połączenie wyników pracy doktorskiej oraz ich dyskusji. Rozdział ten jest bogato ilustrowany 47 rycinami oraz 5 tabelami. Niestety, niektóre z nich nie są wystarczająco czytelne, co utrudnia odbiór tej części pracy i stanowi dla czytelnika pewien dyskomfort (np. rycina 32 oraz tabela 6). W przypadku ryciny 38 skala na obu osiach jest nieczytelna. Uzyskane przez doktorantkę wyniki zostały przedstawione w sposób systematyczny, a każdy z rozdziałów kończy się ich podsumowaniem oraz dyskusją. Opisy doświadczeń w rozdziale pracy doktorskiej dotyczącym metod wykorzystanych podczas jej realizacji są kompletne i szczegółowe w stopniu pozwalającym na powtórzenie badań w innych laboratoriach. Rozdział ten zawiera ryciny i tabele ilustrujące schematy doświadczeń lub prezentujące etapy analizy ułatwiające odbiór zarówno tej części pracy jak i zrozumienie prezentowanych w pracy doktorskiej wyników badań. Mniej czytelny jest rozdział prezentujący wnioski. Doktorantka zdecydowała się na formę opisową. Zdecydowanie bardziej czytelna byłaby forma przedstawiająca wnioski w punktach korespondujących z celami postawionymi przez doktorantkę w ramach realizacji badań do niniejszej pracy doktorskiej. Forma wybrana przez doktorantkę sprawia, że wnioski przybierają formę generalnych stwierdzeń i opisu stanu wiedzy, a nie konkretnego podsumowania własnych przecież wyników badań.

Swoją pracę doktorską mgr Liliana Monika Czernek przygotowywała pod opieką Pana dr hab. Marcusa Düchlera. Promotor jest rozpoznawalnym i cenionym specjalistą w dziedzinie badań nad egzosomami. Praca doktorska została zrealizowana jako część badań dwóch projektów naukowych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, projektu dla młodych naukowców oraz funduszy własnych Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN.

Do rozprawy dołączony został spis prac naukowych doktorantki, na który składają się trzy publikacje, udział w konferencjach krajowych oraz międzynarodowych (w sumie doktorantka jest pierwszym autorem 9 plakatów). Prezentowany w tej części pracy dorobek związany jest z tematem pracy doktorskiej. Wyniki opublikowane zostały w dobrych czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej i składają się na łączny współczynnik oddziaływania (IF) wynoszący 7,17. W wypadku doktorantki taki dorobek należy uznać za znaczny. Dorobek doktorantki oceniam jako bardzo dobry na tym etapie kariery naukowej.

Podsumowując, przedstawione przeze mnie w niniejszej recenzji uwagi i wątpliwości nie umniejszają mojej oceny całokształtu rozprawy, którą uważam za wartościową i oceniam bardzo dobrze. Należy również podkreślić duży nakład pracy eksperymentalnej doktorantki. Wykazała się ona dużą wiedzą teoretyczną w zakresie prowadzonych badań oraz umiejętnościami prowadzenia pracy badawczej na wysokim poziomie. Różnorodność technik wykorzystywanych podczas realizacji badań pozwoliła na wielostronne scharakteryzowanie modelu badań. Biorąc pod uwagę wszystkie elementy przedstawionej powyżej oceny stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Liliany Moniki Czernek spełnia wszystkie niezbędne warunki określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi uzupełnieniami.

W związku z powyższym, z pełnym przekonaniem przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk wniosek o dopuszczenie Pani mgr Liliany Moniki Czernek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Monika Pietrowska, prof. nadzw.

Centrum Badań Translacyjnych
i Biologii Molekularnej Nowotworów