

Prof. dr hab. inż. Dorota G. Pijanowska
Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęcz PAN
ul. Księcia Trojdena 4, 02-109 Warszawa
Tel.: +48 22 659 9143 w. 141
Faks: +48 22 659 7030
E-mail: dpijanowska@ibib.waw.pl

Warszawa, 20 maja 2019r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł rozprawy: „Badanie właściwości mechanicznych oraz zmian nanostrukturalnych zachodzących w strukturach komórkowych indukowanych antybiotykami aminoglikozydowymi i antracyklinowymi stosowanymi w chemioterapii nowotworów złośliwych”

Doktorantka: **mgr inż. Kaja Frączkowska**

Promotorzy rozprawy: dr hab. Marta Kopaczyńska, prof. PWR

dr hab. Jan Masajada, prof. PWR

Promotor pomocniczy: dr inż. Sebastian Kraszewski

Mgr inż. Kaja Frączkowska ukończyła studia magisterskie na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej. Badania związane z rozprawą doktorską były realizowane w Katerze Inżynierii Biomedycznej Wydziału Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem dwóch promotorów dr hab. Marty Kopaczyńskiej i dr hab. Jana Masajady oraz dr inż. Sebastiana Kraszewskiego jako promotora pomocniczego.

TEMATYKA PRACY

Tematyka rozprawy doktorskiej, w pewnym zakresie, jest związana, w szczególności poprzez możliwe wykorzystanie wyników badań, z obszarem medycyny spersonalizowanej. Najogólniej ujmując, dotyczy bowiem badań nad oceną właściwości biomechanicznych mikro- i nano- obiektów, takich jak: cząsteczki DNA - badania w nanoskali, na poziomie molekularnym oraz komórek ludzkich. Zarysowując ogólny cel badań zespołu naukowego pracującego pod opieką dr hab. Marty Kopaczyńskiej, w którym bierze udział Doktorantka, można powiedzieć, że są to badania właściwości biomechanicznych komórek nowotworowych poddanych określonym oddziaływaniom farmakologicznym, mogące znaleźć szczególne zastosowanie np. we wspomaganium, na wczesnym etapie, decyzji o włączeniu odpowiedniego leczenia farmakologicznego.

W przypadku leczenia chorób nowotworowych istotnym celem jest uzyskanie odpowiedniego oddziaływania leków np. cytostatyków z DNA komórek nowotworowych,

które uległy mutacjom, dopasowanie sposobu leczenia do pacjenta oraz zminimalizowanie skutków ubocznych. Zatem szczegółowe cele rozprawy doktorskiej mgr Kai Frączkowskiej wyraźnie sprecyzowane, jako scharakteryzowanie *in vitro* zmian właściwości biomechanicznych (1) cząsteczek DNA oraz (2) komórek nowotworowych, w tym komórek ostrej białaczki szpikowej, po podaniu dwóch grup leków, często współstosowanych w przypadku chorób nowotworowych, tj.: cytostatyków, a w szczególności antracyklin i antybiotyków przeciwbakteryjnych – aminoglikozydów, są niewątpliwie ważkie z punktu widzenia pozyskiwania szerszej informacji na temat ww. oddziaływań. W szczególności Doktorantka zajęła się z badaniami nad wykorzystaniem metod mikroskopii sił atomowych i pęsety optycznej do oceny właściwości biomechanicznych nici DNA i oceny właściwości biomechanicznych komórek pobranych od pacjentów z ostrą białaczkę szpikową, tj. mieloidalnych komórek blastycznych wyizolowane ze szpiku kostnego, czy też erytrocytów - jako komórek bezjądrzastych.

Podsumowując można stwierdzić, że recenzowana rozprawa doktorska wpisuje się w aktualny nurt badań nad rozwojem metod wspomagających dobór farmakoterapii w chorobach nowotworowych, a szerzej, w pewnym zakresie, we wcześniej wspomniany obszar medycyny spersonalizowanej, stanowiący również element dyscypliny inżynieria biomedyczna.

STRUKTURA I ZAWARTOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedłożona rozprawa doktorska zawiera 145 stron, obejmujące 7 rozdziałów, streszczenie w języku polskim i wymagane streszczenie w języku angielskim, oraz 53 rysunki i 13 tabel. Rozprawa jest w postaci tradycyjnej monografii składającej się dwóch części: przeglądu literatury i doświadczałnej. Część pierwsza obejmuje wprowadzenie zawierające: (1) klasyfikację chorób nowotworowych układu krwionośnego, stosowaną diagnostykę i postępowanie terapeutyczne, mechanizm działania i farmakokinetykę antracyklin (podrozdziały 1.1-1.6), (2) podstawy głównych, stosowanych metod badawczych mikroskopii sił atomowych, mikroskopii konfokalnej i pęsety optycznej (podrozdziały 1.19-1.11), (3) cel i tezy pracy w wydzielonym rozdziale 2. Druga część rozprawy jest poświęcona części eksperymentalnej zawiera spis aparatury badawczej i opis metodyki badań (rozdział 3) oraz analizę wyników badań (rozdział 4). Pozostała część pracy przedstawia: podsumowanie (rozdział 5) i wkład własny doktorantki w badania obejmujące rozprawę (rozdział 6). Ostatni rozdział, uzupełniający, zawiera informację o dorobku naukowym Doktorantki (rozdział 7).

Jak wspomniano cel rozprawy został wyraźnie określony na początku, natomiast podsumowanie, w którym zawarto wnioski końcowe stanowi rozdział 5 i 6. Bibliografię (rozdział nienumerowany), na którą składa się 274 dobrze dobranych pozycji literaturowych, z których duża część - 54 publikacje (20%), to publikacje z ostatnich 5 lat (2014-2018). Przedstawiony przegląd literatury został dokonany na podstawie właściwie dobranych pozycji piśmiennictwa dotyczącego przedmiotu rozprawy. Elementy pracy są logicznie powiązane, a ich zamieszczenie w tekście pracy jest uzasadnione.

W rozprawie zostały sformułowane 3 tezy, ujmujące istotę badań: (teza 1) antybiotyki antracyklinowe interkalują w miejsca o specyficznej sekwencji par zasad, powodując zmiany nanostrukturalne podwójnej helisy DNA, (teza 2) antybiotyki aminoglikozydowe indukują selektywną kondensację helisy DNA, wywołując molekularną toroidyzację kwasu

nukleinowego i (teza 3) antybiotyki antracyklinowe wywołują zmiany właściwości mechanicznych kwasu nukleinowego oraz błony komórkowej komórek macierzystych ostrej białaczki szpikowej.

Pierwsza z 3 ww. tez ma najmniejszą wagę, dotyczy bowiem wyniku znanego, natomiast jest łagodnym wprowadzeniem do kolejnych etapów rozprawy oraz do toku rozumowania Doktorantki, pokazując jednocześnie plan eksperymentu. Natomiast 2 pozostałe tezy są właściwie sformułowane i mogą stanowić podstawę artykułów naukowych.

Rozprawa jest napisana w sposób jasny, dobrze zorganizowany oraz z klarownie przedstawionymi i omówionymi wynikami badań.

W części 2. – doświadczalnej, omówiono stosowaną metodykę badań, włączając również podstawy dotyczące pomiarów. Bardzo dobrze zostały przedstawione sposoby przygotowania próbek DNA, jak i próbek pobranych pacjentów chorych na ostrą białaczkę szpikową (ang. *acute myelogenous leukemia*, AML). Komórki blastyczne (proliferyjące komórki prekursorowe) izolowano ze szpiku kostnego i krwi obwodowej, dodatkowo badano erytrocyty - jako komórki bezjądrzaste. Próbkę od pacjentów były pozyskane we współpracy z Kliniką Hematologii, Chorób Krwi i Transplantologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu na podstawie odpowiedniej zgody komisji bioetycznej i zgód pacjentów na wykorzystanie pobranych próbek w badaniach.

Do badań wybrano po trzy najczęściej stosowane leki z każdej z grup antybiotyków. W przypadku antybiotyków przeciwnowotworowych (cytostatyków) z grupy antracyklin były to: doksorubicyna (DOX), daunomycyna (DAU) i epirubicyna (EPI), natomiast w drugiej grupie – przeciwbakteryjnych antybiotyków aminoglikozydowych badano: kanamycynę (KAN), neomycynę (NEO) i tobramycynę (TOB).

Wyznaczono podstawowe wielkości biomechaniczne badanych obiektów, tj. w przypadku nici DNA, takie jak: długość i wysokość nici, współczynnik sztywności, wydłużenie, siła zrywania, a w przypadku komórek blastycznych: współczynnik sztywności (przyrost siły rozciągającej na jednostkę liniowego wydłużenia komórki).

Wspomniana wcześniej metodyka użyta do osiągnięcia celu pracy została starannie przemyślana, doświadczenia ułożone we właściwej kolejności, zaczynając od: (1) określenia zmian strukturalnych DNA pochodzącego z grasicy cielęcej (ang. *calf thymus*, ctDNA) w wyniku oddziaływań z obydwoma grupami antybiotyków, poprzez (2) badania wpływu antracyklin i antybiotyków aminoglikozydowych na właściwości mechaniczne modelowych struktur DNA, tj. cząsteczek DNA o długości 500 pz i określonej zawartości procentowej par zasad guanina-cytozyna (GC): 35%, 52% i 77%, dochodzimy do (3) badań wpływu antybiotyków antracyklinowych na właściwości mechaniczne komórek blastycznych i (4) badań wpływu doksorubicyny na właściwości mechaniczne erytrocytów. Wyniki badań w próbkach pobranych ze szpiku kostnego porównano z wynikami analiz krwi obwodowej, w szczególności erytrocytami. Zastrzeżeń nie budzą również wnioski sformułowane na podstawie uzyskanych wyników. Niemniej jednak kilka uwag krytycznych pojawi się w dalszej części recenzji. Należy podkreślić, że badania z wykorzystaniem próbek biologicznych są badaniami trudnymi, związanymi z odpowiednim przygotowaniem próbek i dyscypliną metodyczną. Dlatego też należy docenić duży nakład pracy poświęcony tego

typu badaniom, wykonanych z wykorzystaniem próbek szpiku kostnego i krwi obwodowej poprzanych od pacjentów z AML (brakuje szczegółów dotyczących opisu grupy pacjentów).

Nadrzędny cel postawiony podczas realizacji rozprawy został osiągnięty. Oryginalną część rozprawy stanowi próba opracowania metody oceny parametrów biomechanicznych komórek blastycznych w AML i ich korelacja z parametrami komórek eksponowanych na oddziaływanie wybranych 2 grup antybiotyków. Badania, wykonane z wykorzystaniem próbek rzeczywistych, posłużyły również do postawienia hipotezy mówiącej, iż antybiotyki antracyklinowe wywołują zmiany właściwości mechanicznych błony komórkowej komórek macierzystych ostrej białaczki szpikowej. Występowanie różnic właściwości mechanicznych komórek nowotworowych i prawidłowych jest znane od pewnego już czasu (Lekka et al., 1999). Kolejne badania w tym zakresie dotyczyły określenia różnic po zastosowaniu odpowiednich środków farmakologicznych, jednakże przeprowadzono je z wykorzystaniem komórek linii komórkowych. Niewątpliwym atutem - elementem oryginalnym, tej rozprawy jest przedstawienie wyników badań prowadzonych z wykorzystaniem próbek rzeczywistych w postaci materiału biologicznego pochodzącego od pacjentów. Przeprowadzono również badania umożliwiające określenie rozkładu leków wewnątrz komórki w czasie inkubacji z lekiem trwającym 3 i 24 godziny. Stwierdzono również, że początkowo DOX występuje w cytoplazmie i częściowo w jądrze komórkowym, natomiast po dłuższym czasie inkubacji następuje alokacja antracykliny do jądra komórkowego. Na tej podstawie dokonano wstępnej interpretacji wskazującej na możliwość utraty sztywności komórek blastycznych AML wynikającą z oddziaływań antracyklin z cytoszkieletem komórkowym oraz z oddziaływań ze strukturami jądra komórkowego, którego objętość w stosunku do objętości cytoplazmy jest stosunkowo duża w przypadku komórek blastycznych AML.

Doktorantka uzyskała interesujące wyniki badań własnych, w tym miejscu podam tylko wybrane, najistotniejsze wyniki.

1. Wszystkie badane antracykliny powodują zmiany nanostrukturalne DNA zależny o udziału par G-C w całej sekwencji. Jednakże charakter tych zmian jest różny, np. największe wydłużenie nici występuje w przypadku oddziaływań z daunorubicyną, aczkolwiek nie są to zmiany proporcjonalne.
2. Wpływ antybiotyków aminoglikozydowych na strukturę DNA jest inny niż antracyklin. W przypadku tobramycyny, zależnie od m.in. pH oraz stosunku stężeń leku i DNA tworzą się struktury typu toroid (1:1), pałeczki (1:5) czy też różnorodne przy stężeniu (10:1).
3. Komórki blastyczne zmieniają swoje właściwości mechaniczne – tracą swoją sztywność, po zastosowaniu antybiotyków antracyklinowych, w różnym stopniu zależnie od zastosowanego leku (w porządku od największego wpływu na zmianę: DOX, EPI, DOU).
 - a. Wskazano, iż możliwość utraty sztywności komórek blastycznych AML, może wynikać z oddziaływań antracyklin z cytoszkieletem komórkowym oraz ze strukturami, stosunkowo dużego w komórkach blastycznych AML, jądra komórkowego.
 - b. Potwierdza się kumulacja antracyklin w błonie komórkowej komórek blastycznych AML, która może wpływać na jej właściwości mechaniczne.

- c. Ważnym wynikiem badań było wskazanie na różne obszary kumulacji poszczególnych antracyklin wewnątrz komórki, np. DOX występuje w obszarze błony komórkowej, cytoplazmy i jądra komórkowego, EPI - głównie w obszarze błony komórkowej, cytoplazmy a DAU – w otoczce jądrowej.
4. Na podstawie zmian właściwości mechanicznych komórek i wewnątrzkomórkowej dystrybucji leku (pkt. 2), podjęto próbę korelacji wyników tych badań z cechami immunofenotypowymi i grupą ryzyka pacjenta (mała grupa pacjentów 6, Tabela 11).
5. Dodatkowo zbadano wpływ na komórki bezjądrzaste – erytrocyty, uzyskane z próbek krwi obwodowej pacjentów. W przypadku tego samego pacjenta oba typy komórek: blastyczne AML i erytrocyty po kontakcie z doksorubicyną następuje około dwukrotne zmniejszenie sztywności. Jest to wynik istotny, który może wyjaśnić pewne etapy występujące podczas farmakoterapii chorych, np. niedokrwistość.

Rozprawa jest bardzo i starannie zredagowana, dobrze zrównoważone proporcje opisu metodyki do wniosków badań, jednakże pojawiają się w niej pewne drobne nieścisłości jak również niejasności, które skłaniają do pewnych pytań, a ja przedstawię je w uwagach krytycznych i edytorskich.

UWAGI KRYTYCZNE

1. W rozprawie również przedstawiono wyniki badań symulacyjnych, dotyczących oddziaływań molekularnych, przeprowadzonych za pomocą metody określanej jako dynamika molekularna, jednak brakuje nawiązania do innych analiz tego typu np. przedstawionych w artykule D.J. Cashmana i G.E. Kellogga „A Computational Model for Anthracycline Binding to DNA: Tuning Groove-Binding Intercalators for Specific Sequences”, (*J. Med. Chem.* 2004, 47, 1360-1374). W artykule są podane rozważania teoretyczne dotyczące oddziaływań cząsteczek antracyklin (doksorubicyny i jej pochodnych, 65 związków) z DNA oraz z 4 zasadowymi sekwencjami o różnym składzie.
2. Opis zjawiska kondensacji DNA z uwzględnieniem tworzenia różnych struktur (toroidy, pałeczki i inne) powinien być nieco szerzej opisany z uwzględnieniem oddziaływań, które mogłyby uformować określone nanostruktury.
3. Kolejne pytanie jest związane z danymi przedstawianymi na rys. 19 i rys. 35 rozprawy, otóż czy dane te są ze sobą powiązane i czy ich interpretacja mogłaby być w pewnym zakresie uwspólniona?
4. W rozprawie używany jest termin „sztywność” w odniesieniu do wielkości, która jest określana współczynnikiem wyrażonym w [pN/μm] m.in. Tabela 10, 11 i inne. Na stronie 45 używany jest termin „współczynnik sztywności” choć w rozprawie proponowałabym posługiwać się terminem „współczynnik sprężystości”. Wyjaśniając podaję, iż sztywność jest cechą a współczynnik sprężystości bądź sztywności jest wielkością fizyczną. Na tej samej stronie rozszerzony kontekst brzmi „badanie współczynnika sztywności zginania pęcherzyków lipidowych”, otóż powinno być badanie współczynnika sprężystości metodą zginania”.
5. Ostatnia uwaga, a właściwie wskazówka dotyczy opisu badanej grupy pacjentów, w tym liczebności (która wymaga znacznego zwiększenia), etc. W pracy zamieszczono stosunkowo mało informacji na temat grupy pacjentów, od których uzyskano próbki do

badani. Niemniej jednak ze względu na fakt, iż wyniki zawarte w tej części rozprawy, związanej z badaniem właściwości mechanicznych komórek blastycznych, są bardzo ciekawe, to rozszerzona informacja z pewnością umożliwiłaby szerszą analizę statystyczną, a może wskazanie możliwości klasyfikacji terapii. Z pewnością warto byłoby do tych wyników zastosować odpowiednią analizę statystyczną, określając czy powstałe różnice/korelacje są statystycznie istotne, co wzmocniłoby to wsparcie interpretacyjne wyników i potencjał publikacyjny. Pewne informacje dotyczące grupy pacjentów pojawiają się dopiero w Tabeli 11.

Ze względu na wartość poznawczą a w przyszłości również aplikacyjną badania powinny być kontynuowane i rozszerzane.

Uwagi redakcyjne

Poniżej wymieniam niektóre z błędów/pomyłek stylistycznych, które występują w rozprawie.

Teza 1 – sformułowanie „antracyklinowe interkalują w miejsca o specyficzne” powinno być zastąpione „antracyklinowe interkalują do miejsc o specyficznej”. Ponieważ interkalacja czyli odbywa się dzięki wsunięciu cząsteczki do określonego miejsca struktury.

Str. 95, Rys. 35 powinien zawierać informację o jednostkach dla wielkości umieszczonych na obu osiach.

Str. 98 (i w całej pracy) przypomnienie, że wielkości mianowane zapisuje się ze spacją pomiędzy liczbą i jednostkami.

W przypadku obiektów policzalnych, takich jak: cząsteczki, komórki, powinno używać się „liczba” a nie „ilość” – np. na str. 50, 63.

PODSUMOWANIE

Podsumowując, recenzowana rozprawa jest opracowaniem dotyczącym nowoczesnej tematyki, świadczącym o dużym rzetelnym zaangażowaniu Doktorantki w wykonanie czasochłonnych badań eksperymentalnych. Należy również podkreślić, iż Doktorantka podejmując badania laboratoryjne musiała zapoznać się z nowymi dla niej zagadnieniami pomiarów z obiektami skali nano, co wymaga dużej dokładności. Zatem Doktorantka wykazała się umiejętnym wykorzystaniem łączeniem wiedzy z różnych obszarów (biologii, biofizyki), oraz umiejętnościami umożliwiającymi właściwe przygotowanie próbek do badań i samych pomiarów metodą AFM i pęsety optycznej. Ponadto należy dodać, że Doktorantka jest krytyczny w stosunku do uzyskanych wyników, w rozprawie zostały przedstawione ograniczenia w odniesieniu do uzyskanych wyników, m.in. uwzględniających ograniczenia sprzętowe pęsety optycznej, w postaci zbyt małej siły rozciągającej, w przypadku badań komórek blastycznych.

Istotnymi wynikami przedstawionymi w rozprawie są: (1) opis porównawczy oddziaływań DNA z antybiotykami antracyklinowymi i aminoglikozydowymi, (2) wskazanie, iż komórki blastyczne zmieniają swoje właściwości mechaniczne – tracą swoją sztywność, po zastosowaniu antybiotyków antracyklinowych, w różnym stopniu zależnie od zastosowanego leku oraz (3) podjęcie próby korelacji zmian właściwości mechanicznych komórek

i wewnątrzkomórkowej dystrybucji leku i cech immunofenotypowych w połączeniu z grupą ryzyka pacjenta.

DOROBEK NAUKOWY DOKTORANTKI

Dodatkowo wspomnę o dorobku publikacyjnym Doktorantki, który jest dobry. Doktorantka jest współautorką 7 artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach, w tym 4 artykuły w czasopismach z bazy *Journal Citation Report* (JCR): *BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY* (1 art., $IF^{2017} = 3,457$, 25 pkt. lista A MNiSW), *JUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL WITH BIOPHYSICS LETTERS* (1 art., $IF^{2017} = 1,935$, 20 pkt. lista A MNiSW), oba z nich są artykułami związanymi z tematem rozprawy, w jednym z nich mgr inż. K. Frączkowska jest 1. autorem. Kolejne 2 artykuły z listy JCR, niezwiązane tematycznie z rozprawą, zostały opublikowane w *BIOMEDICAL RESEARCH INTERNATIONAL* (1 art., $IF^{2017} = 2,583$, 25 pkt. lista A MNiSW) i *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES* (1 art., $IF^{2017} = 3,466$, 35 pkt. lista A MNiSW). Trzy artykuły z ministerialnej listy B zostały opublikowane w czasopiśmie *ACTA BIO-OPTICA ET INFORMATICA MEDICA, INŻYNIERIA BIOMEDYCZNA* (12 pkt. lista B MNiSW), w jednym z nich jest jedynym autorem. Sumaryczny współczynnik wpływu czasopism wynosi 11,441 (141 pkt. MNiSW). Ponadto Doktorantka jest współautorką sześciu doniesień na konferencjach: 3 krajowych i 3 międzynarodowych.

WNIOSEK KOŃCOWY

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Kai Frączkowskiej spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki z dn. 14 marca 2003 roku wraz z późniejszymi poprawkami podanymi w Ustawie "Prawo o szkolnictwie wyższym". Zatem wnoszę o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwzględniając zakres pracy badawczej związanej z doktoratem oraz dorobek publikacyjny Doktorantki, którego główną częścią są 4 artykuły opublikowane w czasopismach z listy JCR o sumarycznym współczynniku wpływu wynosi 11,441 (141 pkt. MNiSW), wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

