

WOJSKOWY INSTYTUT HIGIENY I EPIDEMIOLOGII

im. gen. Karola Kaczkowskiego

01-163 Warszawa, ul. Kozielska 4

tel. 261 853 101 fax 261 853 133

e-mail: kancelaria.jawna@wihe.pl



Warszawa, dnia 20.08.2024 r.

dr hab. n. med. inż. Beata Pająk, prof. WIHE

Zakład Biologii Medycznej

Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii

im. gen. K. Kaczkowskiego

Warszawa

Ocena Rozprawy Doktorskiej

mgr AGNIESZKI BARBARY SZYPOSZYŃSKIEJ

pt.: „Wpływ pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z mezenchymalnych komórek macierzystych na zahamowanie aktywności biologicznej nowotworowych komórek macierzystych raka jajnika”,

wykonana zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej

im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu z dnia 13 czerwca 2024 r.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Agnieszki Szyposzyńskiej składa się z trzech spójnych tematycznie anglojęzycznych publikacji oryginalnych w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences (Int. J. Mol. Sci.), wydawnictwa MDPI o wysokim sumarycznym IF 15,723 (na podstawie IF z roku publikacji, czyli IF 2020 5,923, IF 2023/2024 4,9). We wszystkich publikacjach mgr Agnieszka Szyposzyńska jest pierwszym autorem. Do publikacji załączono wymagane oświadczenia pozostałych współautorów prac, które przekonująco wskazują, iż we wszystkich pracach Pani mgr Agnieszka Szyposzyńska miała większościowy wkład w zakresie: opracowania koncepcji i metodyki badań, hodowli i izolacji pierwotnych komórek raka jajnika, analiz cytometrii przepływowej, analiz RT-PCR, barwień immunofluorescencyjnych, hodowli sferoidów, testów biochemicznych (np. MTT), analizie i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu pierwotnych wersji publikacji. Biorąc pod uwagę fakt, iż wyniki zawarte w publikacjach były poddawane recenzji ekspertów, ich wiarygodność i dobra jakość nie budzą wątpliwości. W pracy doktorskiej nie zawarto informacji na temat finansowania badań, aczkolwiek w publikacji z 2020 r. zawarto informację, iż badania były finansowane ze środków statutowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej (nr 501-20) a wyniki zawarte w publikacji z roku 2023 były częściowo wspierane przez grant NCN 2019/35/B/NZ6/03748, którego kierownikiem był Pan dr hab. Grzegorz Chodaczek.

Do pracy doktorskiej dołączono polskojęzyczne opracowanie, które zawiera: zwięzłe podsumowanie obecnego stanu wiedzy na temat raka jajnika, znaczenia nowotworowych komórek macierzystych oraz podstaw i perspektyw zastosowania w terapii przeciwnowotworowej mezenchymalnych komórek macierzystych, cele pracy, omówienie wyników badań zawartych w kolejnych publikacjach, wnioski oraz aktualne piśmiennictwo, w większości z ostatnich 10 lat. W opracowaniu zawarto także dodatkowe informacje o dorobku naukowym Doktorantki, która poza cyklem publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej, jest współautorką dwóch prac oryginalnych. Strona edytorska przekazanej pracy doktorskiej wraz ze wspomnianym opracowaniem jest bardzo estetyczna, wykonana z troską o detale. Wydruki publikacji zawierających zdjęcia z mikroskopu konfokalnego i kontrastowo-fazowego są wysokiej jakości i umożliwiają analizy obrazów bez konieczności sięgania po wersję elektroniczną. Niby drobiazg, ale pozytywnie wpływa na lekturę pracy.

Poruszona w pracy doktorskiej tematyka dotyczy identyfikacji molekularnych mechanizmów nowych strategii terapeutycznych raka jajnika, w tym tych opartych o terapię z wykorzystaniem mezenchymalnych komórek macierzystych. Rak jajnika jest istotnym problemem klinicznym kobiet o wysokim stopniu złośliwości i niekorzystnych rokowaniach dla pacjentek. Obecne terapie nie przynoszą zadowalających efektów klinicznych, także ze względu na późną wykrywalność i wysoki stopień zaawansowania choroby w momencie rozpoczęcia leczenia. Ważnym problemem są także przerzuty nowotworu do innych organów, w tym wątroby, płuc, mózgu i kości. Doktorantka wskazuje, iż obecne terapie są ukierunkowane na komórki nowotworowe jajnika, o wysokim tempie proliferacji, jednakże pomijają istotną rolę macierzystych komórek nowotworowych (CSCs), które wykazują oporność na chemio- i radioterapię, mają niskie tempo podziałów, przez co nie są wrażliwe na klasyczne chemioterapeutyki powodując nawroty choroby. Dodatkowo, CSCs mają zdolność migracji i unikania eliminacji przez naturalne mechanizmy układu odpornościowego, prowadząc do progresji choroby. Badania ostatnich kilkunastu lat nad mezenchymalnymi komórkami macierzystymi (MSCs) przyniosły wiele ciekawych odkryć i nadziei z nimi związanych, początkowo głównie w obszarach medycyny regeneracyjnej. Ciekawym kierunkiem badań nad MSCs jest ich udział w procesie nowotworzenia, zarówno w kontekście stymulacji jak i hamowania tego procesu. Wyniki badań w tym zakresie nie są do dziś jednoznaczne i wymagają dalszych prac nad rozwikłaniem mechanizmów regulujących zachowanie MSCs w środowisku guza, stąd tematyka badań powzięta przez Doktorantkę jest aktualna i ma ważny charakter poznawczy. Jednym ze sposobów oddziaływań międzykomórkowych są mikropęcherzyki (MV), które działają w środowisku tkanek jako mediatory sygnałów parakrynnych i to one stały się głównym obiektem zainteresowań Doktorantki w pracach badawczych. Należy zaznaczyć, iż wybór tematyki badań jest bardzo ambitny, gdyż odsetek komórek macierzystych w masie guza nowotworowego jest bardzo mały, stąd izolacja wystarczającej populacji komórek do badań jest wyzwaniem i wymaga dużo pracy. Atutem pracy jest fakt, iż Doktorantka izolowała komórki nowotworowe oraz CSCs z próbek klinicznych tkanki pooperacyjnej oraz płynu puchlinowego, co zwiększa wiarygodność uzyskiwanych obserwacji i zachodzących tam zjawisk. Poza nowatorską tematyką badań, Doktorantka zawarła także innowację metodologiczną w pracy doktorskiej, gdyż zaadaptowała do swoich badań najnowszą metodę uzyskiwania stabilnych hodowli komórkowych opartą o transfekcję komórek genem odwrotnej transkryptazy ludzkiej telomerazy (hTERT), uzyskując obecnie najbliższe warunkom fizjologicznym linie komórkowe do badań.

Doktorantka zawarła hipotezę, iż mikropęcherzyki wydzielane przez MSCs mogą regulować aktywność biologiczną macierzystych komórek nowotworowych raka jajnika. Aby zweryfikować te założenia postawiła sobie 6 celów badawczych, w tym: 1) charakterystykę MVs wydzielanych przez unieśmiertelnione komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej, 2) ocenę wpływu unieśmiertelnionych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej na komórki raka jajnika, 3) charakterystykę pierwotnych komórek raka jajnika wyizolowanych z tkanki pooperacyjnej i płynu puchlinowego, 4) ocenę wpływu

unieśmiertelnionych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej na aktywność biologiczną izolowanych z materiału klinicznego pierwotnych komórek raka jajnika, 5) analizę białek pro-i anty-apoptotycznych w unieśmiertelnionych komórkach macierzystych z tkanki tłuszczowej i ich mikropęcherzykach oraz 6) ocenę fenotypu i właściwości biologicznych komórek izolowanych z materiału klinicznego oraz unieśmiertelnionych metodą hTERT.

Do realizacji celów badawczych Doktorantka zastosowała rozległy wachlarz metod badawczych, w tym transfekcje komórkowe, analizy biochemiczne, analizy cytometryczne cyklu komórkowego, oceny indukcji apoptozy, analizy ekspresji genów, obrazowanie metodami fluorescencyjnymi, analizy Western blot oraz inne, szczegółowo opisane w kolejnych publikacjach. Wyniki zostały poddane analizie statystycznej. Co ważne, badania prowadzone były zarówno na liniach komercyjnych jak i liniach pierwotnych, w modelach 2D i 3D, co dodatkowo wzbogaca horyzont obserwacji i pozwala na ich wielokierunkową weryfikację. Ponadto, analizy tak małych struktur jak mikropęcherzyki są kolejnym wyzwaniem metodologicznym. Tak złożony model badawczy oraz mnogość zaangażowanych w badania metod jest atutem recenzowanej rozprawy doktorskiej i świadczy o rzetelności prowadzonych prac badawczych i dużym zaangażowaniu Doktorantki.

W wyniku przeprowadzonych analiz Doktorantka sformułowała korespondujące z postawionymi celami wnioski, iż ad 1 i 2) mikropęcherzyki wydzielane przez unieśmiertelnione komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej były internalizowane do komórek raka jajnika linii ES-2 oraz OAW-42 indukowały ich eliminację, czemu towarzyszyło obniżenie aktywności wydzielniczej komórek raka jajnika, w tym IL-2, IL-15 i IFN γ ; ad 3, 4 i 5) mikropęcherzyki wydzielane przez unieśmiertelnione komórki macierzyste zmniejszały aktywność biologiczną oraz indukowały apoptozę izolowanych z materiału klinicznego pierwotnych komórek raka jajnika co według Doktorantki, było efektem transportu w mikropęcherzykach białek proapoptotycznych, jak Bad, BiD, Bim, kaspaza 3 i innych; ad 6) metoda unieśmiertelniania komórek plazmidem zawierającym gen hTERT jest efektywnym narzędziem unieśmiertelniania pierwotnych komórek nowotworowych przy zachowaniu ich fenotypu co stanowi obiecujące narzędzie do badań nad biologią CSCs w nowotworach.

Zawartość każdej pracy przed publikacją została poddana ocenie przez 3 niezależnych recenzentów, dlatego trudno doszukiwać się istotnych uchybień. Przytoczone wnioski mają swoje pokrycie w prezentowanych wynikach a obszerność danych zawartych w publikacjach jak i materiałach dodatkowych dołączonych do publikacji wyczerpująco je dokumentuje. Prezentowane obserwacje są bardzo ciekawe i zachęcają raczej do merytorycznej dyskusji z Doktorantką na temat dalszych perspektyw rozwoju tej fascynującej strategii terapeutycznej, dlatego pozwolę sobie sformułować pytania, które mogą taką dyskusję zainicjować.

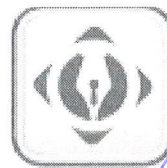
Jak Doktorantka wyobraża sobie zaprojektowanie dalszych badań na modelach zwierzęcych? Czy takie badania są prowadzone? Jak oszacować ilość mikropęcherzyków koniecznych do dostarczenia wystarczającej ilości mediatorów do guza by indukować jego eliminację? Czy mikropęcherzyki należałoby podawać do guza? Jak często? Czy mają one możliwość penetracji w głąb guza? Jak zapewnić powtarzalne źródło mikropęcherzyków z komórek MSCs – bioreaktory? Na ile powtarzalny jest skład białkowy wewnątrz mikropęcherzyka w danych warunkach hodowlanych? Jak to efektywnie badać? Pytań jest wiele, ale przynajmniej, iż rozprawa doktorska rozbudza wyobraźnię w tym obszarze. Chciałabym, aby Doktorantka zaprezentowała krótko swoją wizję na przyszłe badania w tym obszarze, które miałyby przybliżyć to podejście do rozwoju klinicznego.

dr hab. n. med. inż. Beata Pająk, Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Szyposzyńskiej

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Agnieszki Barbary Szyposzyńskiej jest ciekawą, aktualną i wartościową pracą a otrzymane wyniki są bardzo interesujące i ważne poznawczo. Uzyskany IF cyklu publikacji jest bardzo wysoki.

Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Agnieszki Barbary Szyposzyńskiej odpowiada warunkom określonym w art. 187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t.j. Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zm.) i wnoszę do Wysokiej Rady Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Agnieszki Barbary Szyposzyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną przedstawionej rozprawy, wysoki IF cyklu publikacji, złożoność zastosowanych modeli i metod badawczych, oraz ilość włożonej pracy w realizację celów pracy doktorskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.



Electronically signed by:

Beata Teresa Pająk

Date:

2024-08-20 13:21:17

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Beata Pająk', written over the electronic signature icon and its associated text.