

Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii
i Alergologii

Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

ul. Jaczewskiego 8

Lublin 20-950

tel. (81) 724 44 31, (81) 724 42 93

fax (81) 724 48 23

kierownik:

Prof. dr hab. Janusz Milanowski



Department of Pneumology, Oncology
and Allergology

Medical University of Lublin

Poland, Lublin 20-950

Jaczewskiego 8

tel. (+48-81) 724 44 31, (+48-81) 724 42 93

fax (+48-81) 724 48 23

Head:

Prof. Janusz Milanowski MD, PhD

e-mail: pulm.dept@umlub.pl

dr hab. n. med. Anna Grenda

Pracownia Immunologii i Genetyki

Katedry i Kliniki Pneumonologii, Onkologii i Alergologii

Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska autorstwa Pana mgr inż. Bartosza Skóry, w której podstawą jest cykl publikacji pt. „Ocena wykorzystania enkapsulacji liposomalnej oraz nabłonkowego czynnika wzrostu w ukierunkowaniu toksyczności nanocząstek srebra przeciwko komórkom nowotworowym z nadekspresją receptora nabłonkowego czynnika wzrostu” przygotowana została pod kierunkiem promotora – dr hab. n. med. Konrada Szychowskiego, prof. WSiIz.

Ogólne informacje dotyczące rozprawy doktorskiej oraz sylwetki naukowej Doktoranta

Recenzja dotyczy rozprawy doktorskiej przygotowanej przez Pana Bartosza Skórę. Praca liczy 86 stron, i składa się z rozdziałów: Spis treści, Wykaz stosowanych skrótów, Analiza bibliometryczna publikacji wchodzących w skład cyklu stanowiących rozprawę doktorską, Publikacje wchodzące w skład cyklu prac, Podsumowanie i wnioski, Streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim, Opinia Komisji Bioetycznej, Oświadczenia współautorów publikacji, Całościowy dorobek naukowy kandydata, oraz Bibliografia. Zaskakującym nieco jest fakt, że nie ma rozdziału pt. Wstęp, który byłby wprowadzeniem do tematu, natomiast po rozdziale dotyczącym publikacji wchodzących w skład cyklu, znajduje się rozdział Podsumowanie i wnioski, w którym dopiero pojawiają się informacje wstępne dotyczące tematu. W rozdziale Podsumowanie i wnioski, są zawarte również cele badawcze, które winny być umieszczone w odrębnym podrozdziale. Są to uwagi techniczne, które nie dotyczą merytorycznej wartości pracy.

Styl pisania jest jasny i łatwy do zrozumienia. Można odnaleźć drobne błędy gramatyczne czy stylistyczne, ale nie umniejsza to wysokiej wartości merytorycznej rozprawy. Szata graficzna jest poprawna. Należy podkreślić wysokiej jakości graficzne opracowanie artykułów włączonych do cyklu.

Wskazuje to na dbałość Doktoranta o jak najwyższy, czytelny i zrozumiały poziom zaprezentowania swojej pracy naukowej.

Na cykl publikacji składają się trzy artykuły, jeden poglądowy oraz dwie prace oryginalne opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, tj. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *Toxicology and Applied Pharmacology* oraz *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Łączny współczynnik wpływu (Impact Factor) cyklu publikacji wyniósł 16,320, a łączna wartość punktowa MEiN publikacji wyniosła 340. We wszystkich pracach Aplikant jest pierwszym, a zarazem korespondencyjnym autorem.

Na uwagę zasługuje całościowy dorobek naukowy Aplikanta. Liczba wszystkich publikacji łącznie z pracami wchodzącymi w skład cyklu: 26, całkowita liczba cytacji (bez autocytowań): 148, natomiast Indeks Hirsha Aplikant przedstawia jako 7, jednak nie jest to potwierdzone przez analizę bibliometryczną. Przedstawiona w rozprawie analiza dotyczy jedynie artykułów wchodzących w skład cyklu, natomiast informacje o całościowym dorobku naukowym nie są potwierdzone bibliometrycznie. Niemniej jednak wykazany przez Doktoranta dorobek naukowy jest imponujący, to jest: sumaryczna wartość wskaźnika IF: 126,186, natomiast sumaryczna liczba punktów MEiN: 2580 pkt.

Aplikant wskazuje, że jest autorem trzech posterów naukowych i dwóch wystąpień na konferencjach krajowych. Był również kierownikiem i wykonawcą w projektach naukowych. Jest współautorem zgłoszenia patentowego. Wykazuje się również działalnością popularyzującą naukę.

Wartość merytoryczna rozprawy

Pan mgr inż. Bartosz Skóra podjął się wykonania oceny możliwości wykorzystania enkapsulacji liposomalnej oraz nabłonkowego czynnika wzrostu w ukierunkowaniu toksyczności nanocząstek srebra przeciwko komórkom nowotworowym z nadekspresją receptora EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*). Dokonał solidnego przeglądu literaturowego tematów związanych z możliwościami zastosowania nanocząsteczek srebra, sposobu ich przygotowania oraz cytotoksyczności względem komórek nowotworowych, który dał podstawę do przygotowania niezwykle ciekawej pracy przeglądowej '*A concise review of metallic nanoparticles encapsulation methods and their potential use in anticancer therapy and medicine*' (liczba zacytowanych artykułów - 213). Autor w sposób bardzo jasny i przystępny przedstawił możliwości ograniczenia kontaktu powierzchni toksycznych nanocząsteczek metalicznych z komórkami, poprzez enkapsulację - różne jej sposoby, która polega na zamknięciu ich w warstwach organicznych. Poruszył również zagadnienia specyficznego ukierunkowania działania na komórki nowotworowe. Na uwagę w tym artykule zasługuje dbałość o

oprawę graficzną – czytelne ryciny w znakomitej jakości przedstawiające rodzaje i metody entrappingu, a także wady i zalety metod zamknięcia nanocząstek w warstwach organicznych.

Drugim artykułem włączonym do cyklu będącego podstawą ocenianej tu rozprawy doktorskiej jest oryginalna praca badawcza zatytułowana '*Epidermal Growth Factor-labeled liposomes as a way to target the toxicity of silver nanoparticles into EGFR-overexpressing cancer cells in vitro*'. Jest to bardzo interesujący manuskrypt na temat ukierunkowanego działania liposomalnych nanocząstek srebra połączonych z EGF – ligandem dla EGFR. Ta strategia miała na celu dostarczenie nanocząstek w sposób preferencyjny do komórek nowotworowych z nadekspresją EGFR. Doktorant wykorzystał linie komórkowe raka płuca A549 oraz raka języka SCC-15 jako modelowe. Jako kontrolę zastosował linię prawidłowych fibroblastów. Na uwagę w tym artykule zasługuje armamentarium metod użytych w trakcie prowadzenia badań – począwszy od przygotowania koniugatów EGF z liposomami, prowadzenie hodowli komórkowych po testy: redukcji resazuryny, produkcji reaktywnych form tlenu, LDH, aktywności kaspazy 3 i 9, aktywności katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej, RT-qPCR, ELISA, mikroskopi konfokalnej, aż wreszcie zastosowanie metod statystycznych do potwierdzenia istotności uzyskanych wyników. Jest widoczne, że Doktorant ma doskonały warsztat badawczy, jest solidnie przygotowany do podejmowania wyzwań naukowych. Wyniki badań przeprowadzonych przez Doktoranta przedstawione w przytaczanej tu publikacji wskazują, że w komórkach na które działano kompleksami EGF-LipoAgNPs doszło do wzrostu aktywności kaspazy-9, co było związane z indukcją apoptozy z udziałem szlaku mitochondrialnego. Dalej, Aplikant wskazuje, że łączyło się to z zaburzeniem równowagi *redoks* w komórce czy zmianą potencjału błony mitochondrialnej. Ponadto, wyższa aktywność kaspazy-9 została zaobserwowana w komórkach raka języka w porównaniu do komórek raka płuca. Doktorant konkluduje, że liposomy charakteryzują się opóźnionym działaniem w stosunku do natywnych AgNPs, co wiąże się z uwalnianiem większej ilości jonów Ag w komórce, skutkując wzmożoną indukcją apoptozy. Autor wskazuje również, że zamknięcie jonów Ag w liposomach ma działanie ochronne dla komórek zdrowych, a zwiększające toksyczność w komórkach nowotworowych w porównaniu do natywnych nanocząstek srebra. Reasumując wyniki, Doktorant wskazuje na to, że stworzony system liposomalny zmniejsza toksyczność nanocząstek srebra wobec prawidłowych ludzkich fibroblastów oraz wzmacnia cytotoksyczne i proapoptotyczne ich działanie w stosunku do komórek raka płuca A549 oraz raka języka SCC-15, co jest wynikiem ukierunkowanego dostarczania do komórek kompleksów EGF-Lipo-AgNP - ich wychwytu przez receptor EGFR, będący w nadekspresji na komórkach rakowych. Przedstawiana tu praca badawcza jest innowacyjna i można wnioskować, że powstała w oparciu o doskonałą znajomość technik badawczych oraz niezwykłą cierpliwość do prowadzenia tego typu badań. Na uwagę w pracy zasługują klarowne wykresy, które w sposób przejrzysty przedstawiają uzyskane wyniki.

Trzecią pracą, składową cyklu, będącego podstawą do przygotowania rozprawy doktorskiej jest artykuł zatytułowany '*Molecular mechanism of the uptake and toxicity of EGF-LipoAgNPs in EGFR-overexpressing cancer cells*'. Jest to kontynuacja poprzedniej pracy badawczej, mająca na celu określenie wpływu EGF-LipoAgNP na geny związane z endocytozą i indukcją toksyczności przez takie liposomy w ludzkich komórkach raka płuca A549 i języka SCC-15. Autor wskazuje, że mechanizm wychwytu i indukcji toksyczności przez liposomowe koniugaty EGF-Ag jest nieznanym, a to badanie miało dostarczyć informacji na ten temat. Wykorzystując antysensowne cząsteczki interferujące siRNA w komórkach A549 i SCC-15 Badacz doprowadził do wyciszenia ekspresji EGFR i porównał dostarczanie lipokompleksów do komórek z wyciszoną ekspresją tego receptora oraz z jego nadekspresją. Doktorant zaobserwował po zastosowaniu EGF-LipoAgNPs wzrost ekspresji mRNA genów związanych z endocytozą klatryno-zależną: *CLTC* (ang. *clathrin heavy chain*) oraz genu *AP2M1* (ang. *adaptor-related protein complex 2 mu 1 subunit*) w komórkach raka płuca i języka z ekspresją EGFR, w porównaniu do linii z wyciszonym interferencyjnie EGFR. Bardzo ważne jest wskazanie przez Autora, że dalsze eksperymenty powinny być wykonywane w trybie *in vivo*, ze szczególnym uwzględnieniem potencjału zastosowania EGF-LipoAgNP w terapiach przeciwnowotworowych.

Uwaga dotycząca tej pracy: nie została użyta w badaniu kontrola w postaci prawidłowych fibroblastów, niemniej jednak nie umniejsza to wartości wyników uzyskanych w drodze przeprowadzonych eksperymentów. Jednak warto wyjaśnić dlaczego nie uwzględniono kontroli w eksperymencie. Druga uwaga dotycząca tego artykułu, to metoda badania ekspresji: oparta jest o analizę mRNA, natomiast wartościowym byłoby porównanie ekspresji mRNA względem ekspresji białka, chociażby w przypadku dwu wymienionych wcześniej genów *CTLC* i *AP2M1*, ponieważ poziom mRNA nie zawsze odzwierciedla ekspresję funkcjonalnych protein.

Podsumowując cykl prac, który jest podstawą rozprawy doktorskiej, należy podkreślić, że jest on bardzo spójny, założenia badawcze są ściśle skupione wokół centralnego punktu: wykorzystania nanocząstek srebra zamkniętych w liposomach, jako czynników w walce z komórkami rakowymi. Autor rozprawy na podstawie swoich prac wyciągnął 5 poprawnie sformułowanych wniosków.

Można konkludować, że Aplikant wykazuje się wysokim stopniem zdeterminowania w prowadzeniu badań oraz przygotowywaniem artykułów, cierpliwością i systematycznością, które to cechy w podejściu naukowym są niezwykle ważne. Ponadto na uwagę zasługuje dbałość o graficzną stronę przygotowywanych publikacji.

Uwagi do rozprawy doktorskiej

1. Uwagę zwraca tłumaczenie na język polski nazwy komórek HUVEC (ang. *human umbilical vein endothelial cells*), co powinno być precyzyjnie przełożone w tekście (zgodnie zresztą z wykazem

skrótów zawartym w rozprawie) jako ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej, zamiast komórki śródbłonna naczyń krwionośnych.

2. Jeśli chodzi o cel badawczy, dotyczy on receptora EGFR, którego nadaktywność związana z nadmierną jego ekspresją lub mutacjami aktywującymi w jego genie, jest szeroko opisywana w literaturze. Nadekspresja/mutacje prowadzą do zwiększenia aktywności szlaków wewnątrzkomórkowych, poprzez autofosforylację kinazy tyrozynowej EGFR, co wiąże się ze wzmożoną proliferacją i ułośliwieniem komórek nowotworowych. Nadekspresja *EGFR* została zidentyfikowana w wielu różnych nowotworach, w tym głowy i szyi, pęcherza moczowego, przełyku, żołądka, mózgu, piersi, endometrium, okrężnicy i płuca. Doktorant w swoich pracach badawczych posłużył się liniami komórkowymi A549 (rak płuca) i SCC-15 (rak języka) z nadekspresją EGFR. W związku z tym, powstaje pytanie, czy były rozważane inne linie komórkowe? Co więcej, Pan Bartosz Skóra opisuje podstawowe i ogólne informacje o receptorze EGFR, skupiając się przede wszystkim na enkapsulacji cząsteczek nanosrebra. Jest to słuszne podejście, jednak zabrakło w rozprawie, może nie w samych artykułach, ale we wprowadzeniu do rozprawy, nieco informacji o znaczeniu terapii anty-EGFR w terapii raka płuca.
3. Dalej, nawiązując do punktu 2: nie ma żadnych informacji co w przypadku mutacji EGFR, zwłaszcza tych aktywujących – czy wykorzystanie EGF-LipoAg również mogłoby przynieść takie spektakularne wyniki, bez nadekspresji EGFR, a ze zmutowaną nadaktywną formą tego receptora?
4. Interesującym jest dlaczego Autor ukierunkował się w badaniach na EGFR, a nie na inne receptory czy ligandy, które również ulegają nadekspresji na komórkach nowotworowych. Dalej, badania Doktoranta są oryginalnym i znacznym wkładem w poszerzenie wiedzy na temat potencjału zastosowania nowych terapii w onkologii. Czy można prosić, aby Doktorant przedyskutował możliwości ukierunkowania liposomalnych nanocząstek srebra na inne cele receptorowe w raku płuca?

Powyższe uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości przedstawianego przedsięwzięcia badawczego, a jedynie wynikają z poczucia, że prace badawcze zostały wykonane bardzo rzetelnie i są podstawą do kontynuacji badań na szczepie *in vivo* oraz z wykorzystaniem innych celów receptorowych komórek nowotworowych.

Podsumowanie

Recenzowana rozprawa doktorska Pana Bartosza Skóry spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami). Wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Nauk Medycznych CM Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie Pana mgr inż. Bartosza Skóry do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, wnioskuje o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana Bartosza Skóry, na podstawie tego, że przedstawione treści w rozprawie są innowacyjne, oryginalne, opracowane z ogromną dbałością o zakres merytoryczny i graficzny. Wyniki badań znacznie poszerzają wiedzę na temat możliwych zastosowań nanocząstek srebra w terapiach przeciwnowotworowych, ukierunkowanych na receptor EGFR oraz dają możliwość pogłębienia prac naukowych z potencjałem aplikacyjnym w ujęciu klinicznym.

Lublin, 31.03.2023r.

Handwritten signature in blue ink, reading "Anna Genda".