



Poznań, 09.06.2025

Hanna Dams-Kozłowska, prof. dr hab.
Katedra Biotechnologii Medycznej
Zakład Immunologii Nowotworów
w miejscu

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agaty Henschke
pt. "Wpływ liposomów załadowanych fisetyną na komórki senescentne
indukowane terapią" (ang. "The influence of fisetin-loaded liposomes on
therapy-induced senescent cells")

Zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z dnia 21 lutego 2025 roku wykonałam recenzję rozprawy doktorskiej mgr Agaty Henschke. Przedstawiona do recenzji praca doktorska została przygotowana pod kierunkiem prof. UAM dr hab. Luisa Emersona Coy Romero oraz dr. Sergio E. Moya. Praca jest z dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Rozprawa została napisana w języku angielskim. Praca doktorska w głównej mierze dotyczy opracowania i charakterystyki modelu komórek starzejących się indukowanych terapią, opracowania i charakterystyki nośników leków typu liposomy załadowanych fisetyną oraz oceny aktywności fisetyny wolnej i dostarczonej za pomocą liposomów wobec komórek senescentnych i kontrolnych.

Rozprawa doktorska ma charakter monografii. Praca zawiera 127 stron i składa się z następujących części stanowiących główne rozdziały: (i) Wstęp, (ii) Cel pracy, (iii) Materiały i metody, (iv) Wyniki i dyskusja oraz (v) Wnioski. Rozdział pt. Wnioski i dyskusja ma nietypową strukturę tj. zbudowany jest z trzech podrozdziałów odnoszących się do różnych etapów pracy. W każdym podrozdziale w pierwszej kolejności opisane zostały uzyskane wyniki w połączeniu z krótką dyskusją dotyczącą bezpośrednio opisywanych zagadnień, a w ostatniej części danego podrozdziału dołączono szerszą dyskusję odnoszącą się do doniesień literaturowych. Ponadto w rozprawie zawarto spis skrótów, spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, bibliografię, oraz spisy rycin, tabel i równań. Kolejność rozdziałów i proporcje pomiędzy poszczególnymi częściami są prawidłowe, a ich rozmiar jest uzasadniony zawartością. Streszczenie w sposób syntetyczny opisuje treść pracy.

We wstępie Autorka przybliży czytelnikowi zagadnienia poruszane w rozprawie doktorskiej. W pierwszej kolejności opisano proces starzenia komórkowego, a także przedstawiono charakterystykę komórek senescentnych. Ze szczególną starannością omawiane są takie cechy jak zatrzymanie cyklu komórkowego, zmiana morfologii komórek oraz fenotyp wydzielniczy związany ze starzeniem (SASP). Następnie Autorka skupia się na opisie procesów związanych z indukcją procesu starzenia komórkowego wywołanego terapią, a także metod stosowanych do wykrywania komórek senescentnych. Osobny podrozdział przedstawia znaczenie procesu senescencji w rozwoju nowotworów zwracając na podwójną rolę jaką mogą pełnić komórki starzejące się, tj. zarówno pozytywną,

przyczyniającą się do zwalczania nowotworów, jak i negatywną, tj. wspomagającą rozwój choroby nowotworowej. Wykazanie znaczenia komórek starzejących się w procesie nowotworowym stanowi dobrą podstawę do uzasadnienia stosowania terapii ukierunkowanych właśnie na komórki o takich cechach. W kolejnym podrozdziale opisano próby terapii skierowanych na komórki senescentne ze szczególnym uwzględnieniem użycia leku fisetyny. W ostatniej części wstępu Autorka skupia się na przedstawieniu założeń stosowania systemów dostarczania leków. Przedstawiono zalety i wady nośników leków typu liposomy, a także zestawiono tabelarycznie zaakceptowane przed amerykańską Agencją Żywności i Leków (FDA) oraz Europejską Agencją Leków (EMA) protokoły lecznicze wykorzystujące liposomy jako nośniki leków. Podsumowując, należy podkreślić, że informacje zawarte we wstępie są odpowiednim wprowadzeniem w tematykę pracy, a także uzasadniają cel podjętych badań. Warte odnotowania są starannie przygotowane ryciny przedstawiające w przystępny sposób opisywane zagadnienia. Szkoda, że opisy rycin są bardzo skrótowe i przez to mało informatywne.

Jak już wspomniano powyżej zagadnienia poruszane we wstępie pracy uzasadniają cel badań. W kolejnym rozdziale cel główny pracy został zrozumiale sformułowany, a dodatkowo zdefiniowano trzy cele szczegółowe skupiające się na i) opracowaniu protokołu wyprowadzenia komórek starzejących się, ii) przygotowaniu liposomów załadowanych fisetyną oraz iii) analizie dostarczania i aktywności fisetyny wolnej i załadowanej w liposomach w komórkach starzejących się i kontrolnych.

Rozdział Materiały i metody zawiera jasno, przystępnie i stosunkowo szczegółowo opisane procedury eksperymentalne użyte w pracy doktorskiej. Nie zauważyłam żadnych poważnych błędów w opisie metod. Użyte materiały zostały w większości zawarte w tabelach. Niestety część tabel nie jest w ogóle cytowana, a część jest błędnie cytowana w tekście, co utrudnia odpowiednie dopasowanie materiałów do metody. Ustalenie stosowanej dawki liposomów załadowanych fisetyną opierało się na pomiarze fluorescencyjnym fisetyny. Odpowiednio do badań kontrolnych stosowano liposomy puste (bez leku), jednak brak jest informacji dotyczących sposobu określenia ich stężenia. Proszę, aby mgr Agata Henschke przedstawiła podczas obrony pracy doktorskiej metodę wyznaczenia stężenia pustych liposomów.

W kolejnym rozdziale zaprezentowano uzyskane wyniki oraz przeprowadzono dyskusję. Rozdział ten jest podzielony na trzy podrozdziały, a każda część odpowiada pojedynczemu celowi szczegółowemu. Początkowo opracowano protokół uzyskania komórek senescentnych dla dwóch linii komórkowych: i) komórek niedrobnokomórkowego raka płuc (A549) oraz ii) fibroblastów płucnych (WI38). Dodatkowo przeprowadzono dokładną charakterystykę uzyskanych komórek pod względem opisanych w literaturze cech komórek starzejących się. Należy podkreślić, że analiza ta nie ogranicza się tylko do jednej czy dwóch wybranych cech, ale można uznać ją za bardzo kompleksową. Przeprowadzone badania wykazały różnicę w manifestacji senescencji pomiędzy liniami komórkowymi (np. ogniska heterochromatyny związane ze starzeniem (SAHF) występowały w starzejących się komórkach WI38, podczas gdy było ich brak w senescentnych komórkach A549), co podkreśla potrzebę oceny wielu parametrów, aby prawidłowo stwierdzić, czy komórka jest w stanie senescentnym. Należy zauważyć, że mgr Agata Henschke opanowała wiele technik z dziedziny biologii komórki, aby prawidłowo przeprowadzić tę część doktoratu. Podsumowując, pierwsza część rozprawy doktorskiej została dobrze zaplanowana, metody badawcze zostały dobrane prawidłowo dzięki czemu cel pracy został osiągnięty. Recenzent zastanawia się, dlaczego wybrano ocenę ekspresji genów kodujących lamininę A i B2, skoro spadek ekspresji lamininy B1 jest uznawany jako marker komórek starzejących się, co było także przedstawione w dyskusji. Proszę o ustosunkowanie się do tego pytania mgr Agaty Henschke podczas obrony pracy doktorskiej.

Duga część Wyników i dyskusji dotyczy opracowania protokołu wytwarzania liposomów załadowanych fisetyną oraz ich fizykochemicznej i biologicznej charakterystyki. Liposomy przygotowano za pomocą metody hydratacji cienkowarstwowej filmu lipidowego, a następnie



przeciskania liposomów przez membrany. Uzyskane liposomy oceniono pod względem rozmiaru, wskaźnika polidispersyjności (PDI), potencjału dzeta, morfologii oraz efektywności ładowania leku. Dzięki zastosowaniu opracowanego protokołu skutecznie wyprodukowano liposomy załadowane lekiem, a ich charakterystyka została przeprowadzona w sposób nie budzący zastrzeżeń. Dodatkowo przeprowadzono analizę cytotoksyczności pustych liposomów oraz ich internalizacji do komórek. Chociaż uzyskane wyniki wykazały brak toksyczności pustych liposomów w stosunku do komórek kontrolnych i starzejących się, co jest korzystne, to jednak internalizację liposomów do komórek oceniono jako ograniczoną, co jest niekorzystne pod względem dostarczania leków. Pomimo, że Kandydatka przeprowadziła dyskusję na temat sposobów zwiększenia procesu internalizacji liposomów do komórek, to jednak chciałabym, aby podczas obrony zaproponowała potencjalne rozwiązanie tego problemu. Jak można zmodyfikować uzyskane liposomy, aby zwiększyć ich internalizację komórkową?

Trzecia i ostatnia część rozdziału Wyniki i dyskusja zawiera analizę aktywności cytotoksycznej fisetyny wolnej i załadowanej w liposomach wobec komórek kontrolnych i starzejących się. Uzyskane wyniki wykazały brak efektu cytotoksycznego i selektywności działania leku w zakresie testowanych stężeń wobec badanych komórek. Chociaż nie wykazano efektu senolitycznego fisetyny, uzyskano jego działanie senomorficzne. Zarówno fisetyna wolna jak i dostarczona za pomocą liposomów obniżała wydzielanie prozapalnych cytokin, a zastosowanie liposomów zwiększało efekt senomorficzny przy tym samym stężeniu fisetyny. Autorka w dyskusji przedstawia przykłady stosowania fisetyny, które manifestują się w zróżnicowany sposób wskazując na niejednoznaczny sposób jej działania. Jednak trudno jest porównać wyniki uzyskane w pracy doktorskiej do wyników literaturowych, ponieważ brak jest informacji czy w pracy doktorskiej stosowano fisetynę w tym samym zakresie stężeń co w literaturze. Bardzo proszę o ustosunkowanie się Kandydatki do tego zagadnienia.

W ostatnim rozdziale mgr Agata Henschke podjęła próbę wyciągnięcia wniosków z otrzymanych rezultatów. Większość treści zawartej w tym rozdziale stanowi powtórzenie uzyskanych wyników, co pozwala na ich przypomnienie i usystematyzowanie. Dopiero w ostatnim akapicie tego rozdziału zostały poprawnie sformułowane wnioski o charakterze ogólnym.

Praca została napisana językiem fachowym i przystępnym. Jest poprawna stylistycznie, chociaż Autorka nie ustrzegła się potknięć interpunkcyjnych i gramatycznych. Jak już wspomniano powyżej numeracja Tabel i ich cytowanie w teście w rozdziale Materiały i metody jest błędne. Także niektóre skróty nie są wyjaśnione w momencie stosowania ich po raz pierwszy, czasami pisownia skrótów jest różna (np. IL-6 vs. IL6), lub nieprawidłowo pisane są nazwy ludzkich genów. Należy podkreślić, że drobne usterki, które pojawiły się manuskrypcie, nie wpłynęły negatywnie na wartość merytoryczną pracy oraz ogólne dobre wrażenie.

Podsumowując, praca doktorska dotyczy ciekawego i niezwykle aktualnego zagadnienia. Leczenie nowotworów jest bardzo skomplikowane, co wynika ze złożoności procesów zachodzących nie tylko w komórkach nowotworowych, ale także w ich środowisku. Zmiany te wykraczają poza zjawiska mutacji genetycznych komórek. Komórki nowotworowe dostosowują się i modyfikują swoje mikrośrodowisko, co ostatecznie chroni je przed eliminacją wynikającą z działań obronnych organizmu lub leczenia. Opracowanie terapii skierowanej na nowotworowe komórki senescentne, chociaż dotyczy tylko jednego aspektu złożonej choroby nowotworowej, jest bardzo ważne i w połączeniu z innymi sposobami leczenia mogłoby przyczynić się do bardziej skutecznej walki z nowotworami. W badanym modelu wykazano efekt senomorficzny fisetyny, który także jest bardzo istotny, ponieważ może modyfikować mikrośrodowisko guza. Oprócz wartości merytorycznej pracy doktorskiej na podkreślenie zasługuje różnorodność metod stosowanych podczas realizacji badań. Kandydatka opanowała warsztat nie tylko z dziedziny biologii molekularnej oraz biologii komórki, ale także z zakresu inżynierii

materiałowej. Praca jest interdyscyplinarna. Jestem przekonana, że uzyskane doświadczenie przyczyniło się do znacznego rozwoju naukowego mgr Agaty Henschke.

Po zapoznaniu się z przedłożoną rozprawą doktorską stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w art. 187 ust. 1-2 i art. 190 ust. 3 Ustawy z dn. 20.07.2018 r. Prawo o Szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571) i zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Agaty Henschke do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Z poważaniem,

A handwritten signature in dark ink, reading "Hanna Dams-Kozłowska". The script is cursive and fluid, with the first letters of the first and last names being capitalized and prominent.

Hanna Dams-Kozłowska