



OCENA ROZRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Agaty Henschke

pt. „*Wpływ liposomów załadowanych fisetyną na komórki senescentne indukowane terapią*”

wykonanej

w Centrum NanoBioMedycznym Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu

pod kierunkiem dr. hab. Luisa Emersona Coy Romero, prof. UAM oraz dr. Sergio Moya

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne UAM.

1. Charakterystyka formalna rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Agaty Henschke pt. „*Wpływ liposomów załadowanych fisetyną na komórki senescentne indukowane terapią*” została przygotowana w języku angielskim i oparta jest na klasycznym opisie obejmującym omówienie wyników.

Praca została opatrzona streszczeniem zarówno w języku angielskim, jak i polskim, Rozprawa doktorska zbudowana została w typowy sposób i zawiera rozdziały takie jak: Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki z dyskusją, Podsumowanie, Spis Bibliografii, oraz Indeks Rycin i Tabel.

Wstęp zawiera przegląd literaturowy dotyczący procesów starzenia komórkowego (senescencji) w komórkach prawidłowych i nowotworowych, roli fisetyny w senoterapii oraz systemów dostarczania leków, ze szczególnym uwzględnieniem liposomów. Doktorantka szczegółowo opisuje cechy komórek senescentnych, takie jak zmiany w cyklu komórkowym, morfologię oraz specyficzny stan fizjologiczny SASP (ang. Senescence-Associated Secretory Phenotype), charakteryzujący się wydzielaniem cząsteczek sygnałowych (chemokin, cytokin, proteaz i czynników wzrostu). Omówione zostały także czynniki wywołujące starzenie komórkowe, w tym chemioterapeutyki, oraz metody identyfikacji komórek senescentnych i ich odróżniania od komórek apoptotycznych.

Część wprowadzająca została przygotowana starannie, oparta na odpowiednich źródłach literaturowych. Jest zrozumiała, syntetyczna i trafnie wprowadza w tematykę pracy. Ilustracje, choć nieliczne, są dobrze dobrane.

2. Przedmiot i cele rozprawy oraz zastosowana metodyka badawcza

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Agaty Henschke dotyczy zagadnienia obejmującego badania potencjału rozwiązań z zakresu syntezy i wykorzystania nanocząstek w zastosowaniach

biomedycznych. Doktorantka skupiła się w pracy na wykorzystaniu nanocząstek liposomowych stanowiących nośnik dla fisetyny- naturalnego związku niskocząsteczkowego (polifenolu flawonoidowego) w potencjalnej terapii niedrobnokomórkowego raka płuca.

Cele pracy zostały podzielone na jeden cel główny- opracowanie systemu dostarczania fisetyny, naturalnego czynnika o potencjalnych właściwościach senoterapeutycznych do komórek senescentnych w nowotworowej linii komórkowej. Głównym uzasadnieniem dla podjętych badań było stwierdzenie, iż nie wszystkie komórki nowotworowe ulegają eliminacji po zastosowaniu chemioterapii, a te pozostające mogą przejść w stan senescencji pod wpływem małych ilości chemioterapeutyków. Tak zmienione komórki ze stanu senescentnego mogą ponownie przejść powrotnie do fazy podziałów, stanowiąc tym samym potencjalne źródło przerzutów nowotworowych. Zatem, podejścia senoterapeutyczne mogłyby wspomóc leczenie nowotworów, pozwalając na eliminację komórek opornych na standardową terapię, zapobiegając tworzeniu przerzutów.

Do celów szczegółowych Doktorantka zaliczyła:

1. opracowanie protokołu indukcji procesu senescencji w warunkach wielkoskalowych w oparciu o wykorzystanie doksorubicyny – utworzenie właściwego, stabilnego modelu badawczego;
2. opracowanie protokołu formułacji liposomów z jednoczesną enapsulacją fisetyny;
3. określenie właściwości biologicznych i potencjału funkcjonalnego kompleksu liposomowego z fisetyną.

Cele pracy Doktorantka zrealizowała w następujących etapach:

1. opracowanie protokołu indukcji senescencji komórek niedrobnokomórkowego raka piersi (linia A549) oraz prawidłowych komórek fibroblastów płucnych (kontrolna linia WI38) w oparciu o dostępne dane literaturowe;
2. charakterystyka linii komórkowych pod kątem analizy markerów senescencji;
3. synteza chemiczna liposomów wraz z enapsulacją fisetyny;
4. charakterystyka parametrów fizykochemicznych kompleksów liposomowych;
5. badanie aktywności kompleksów z fisetyną w warunkach *in vitro*.

Celem pierwszej części pracy było opracowanie protokołu indukcji senescencji w warunkach *in vitro* za pomocą niskich stężeń doksorubicyny. Wyzwaniem powyższego podejścia był taki dobór stężenia chemioterapeutyku który, z jednej strony pozwoliłby na zaindukowanie procesu senescencji, z drugiej zaś jednak- na utrzymaniu właściwego profilu żywotności komórek. Zaindukowane linie komórkowe zostały następnie poddane analizie pod kątem występowania cech przypisywanych komórkom senescentnym. W tym celu Doktorantka przeprowadziła badanie: żywotności komórek (test WST-1 oraz Live/Dead), obecności markerów senescencji- histochemiczne badanie aktywności SA- β -gal (senescence- associated beta-galactosidase), pomiaru wielkości komórek (obserwacja mikroskopowa), poziomu ekspresji laminin LMNA i LMNB2 (badanie ekspresji genów za pomocą qRT-PCR oraz poziomu sekrecyjnych białek - interleukin IL-6 i IL-8 (test Elisa).

Druga część pracy zakładała opracowanie protokołu syntezy liposomów, skuteczną enapsulację fisetyny przyłączającą się za pomocą wiązań hydrofobowych do błon lipidowych w strukturze liposomu. Otrzymane

kompleksy liposomowe były następnie charakteryzowane pod kątem wielkości i morfologii przy użyciu metody DLS (dynamic light scattering) oraz mikroskopii Cryo-SEM. Poziom ekapsulacji i załadowania kompleksu fisetyną został oceniony za pomocą spektrofluorymetrii w oparciu o właściwości fluorescencyjne związku.

Następnie, kompleks liposomowy został przetestowany w przygotowanych uprzednio liniach komórkowych zdrowych fibroblastów oraz linii nowotworowej. Wyznakowane fluorescencyjnie liposomy zostały podane do komórek w celu oceny ich potencjału wnikania do wnętrza komórki za pomocą laserowej konfokalnej mikroskopii skaningowej (CLSM). Efekt funkcjonalny badanych kompleksów – ich aktywność senomorficzna i senolityczna, został określony w oparciu o badanie proliferacji komórkowej, sekrecji interleukin IL-6 i IL-8 oraz żywotności linii komórkowych A549 oraz WI38.

Podsumowując, aby zrealizować założone cele badawcze, Doktorantka zastosowała szereg technik chemicznych, biologicznych oraz biofizycznych. Zostały one opisane w odpowiednim rozdziale „Materials and Methods”.

3. Najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy

Zgodnie z Wnioskami zawartymi w ostatniej części rozprawy doktorskiej, za najważniejsze osiągnięcia pracy Doktorantka wskazuje:

1. opracowanie protokołu indukcji senescencji za pomocą doksorubicyny prowadzącej do efektywnego wywołania senescencji w komórkach, co potwierdza niska śmiertelność komórek przy zachowaniu markerów senescencji. Doktorantka podkreśla, iż obserwowany efekt indukcji senescencji jest zależny (specyficzny) od rodzaju badanej linii, komórki senescentne nie tylko utrzymują wysoki poziom aktywności metabolicznej, ale wykazują jej znaczący wzrost (4 i 6-krotny wzrost, odpowiednio dla zdrowych fibroblastów i linii nowotworowej w porównaniu do linii nieindukowanej). Dodatkowo, kluczową obserwacją jest brak zdolności komórek senescentnych do podziałów komórkowych, choć, jak zauważa Doktorantka, komórki nowotworowe wykazują tendencję do ponownego wchodzenia w cykl podziałów komórkowych w kulturze długoterminowej (ok. miesiąc hodowli). Wreszcie- podwyższony poziom IL-6 i IL-8 potwierdza uzyskanie fenotypu typu SASP;
2. uzyskanie liposomów potwierdzone badaniami fizykochemicznymi, skuteczna enkapsulacja fisetyny oraz efektywne wnikanie kompleksów liposomowych do wnętrza komórki;
3. w kontekście właściwości biologicznych/potencjalnie terapeutycznych liposomów brak właściwości senolitycznych, ale wykazanie właściwości senomorficznych oraz fakt, iż fisetyna dostarczona do komórek za pomocą liposomów wykazuje większą aktywność biologiczną niż w formie wolnej.

4. Komentarze i pytania

1. Mocne strony pracy

Praca mgr Agaty Henschke łączy w sobie zarówno elementy badań podstawowych, jak i próbę wykorzystania nanotechnologii w badaniach aplikacyjnych. Dotyczy także aktualnego i istotnego problemu terapii

nowotworów. Moim zdaniem, te tematyka pracy doktorskiej dobrze wpisuje się również w podejścia zmierzające do poszerzania nowych protokołów leczenia adjuwantowego dla wielu chorób, a w szczególności nowotworów. W obliczu coraz powszechniej obserwowanej oporności na leczenie, a co za tym idzie- częstych przerzutów czy nawrotów choroby, bardzo interesującym i potencjalnie, niezwykle obiecującym wydaje się być także skierowanie leczenia na procesy związane ze starzeniem komórkowym.

Mocną stroną pracy doktorskiej jest użycie ciekawych, nowoczesnych metod badawczych, w tym szczególnie cytometrii obrazowej czy mikroskopii Cryo-SEM. Na szczególne zainteresowanie, moim zdaniem, zasługuje, wykorzystanie otrzymanych kompleksów liposomowych w badaniach funkcjonalnych różnicujących ich aktywność w kierunku działania senomorficznego, zamiast senolitycznego.

2. Słabe strony pracy

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki, zostały opisane mało starannie. W pracy brakuje konkretnych porównawczych danych liczbowych. Nade wszystko jednak, uzyskane wyniki nie zostały opatrzone analizą statystyczną. W całej pracy znalazłam jeden wykres dotyczący analizy ekspresji genów LMNA i LMNB2, który zawiera elementy analizy statystycznej. Pozostałe dane nie zostały poddane takiej analizie. Nie ma zatem informacji o uzyskanej istotności statystycznej, sile analizy, zastosowanych testach. Moim zdaniem, jest to poważny błąd. W przypadku wielu przeprowadzonych analiz, obserwowane zmiany są „subtelne” lub „niewielki”, jak o nich zresztą pisze sama Doktorantka. W przypadku każdej zmiany, spodziewamy się widzieć, jak odnosi się ona do pomiaru kontrolnego i czy może mieć znaczenie. W przypadku zmian „niewielkich” jest to szczególnie istotne, ponieważ brak właściwie przeprowadzonej analizy wpływa na błędną/nieprawdziwą interpretację wyników. Brak takich analiz jest jednoznacznie dyskwalifikujący w przypadku próby publikacji wyników.

Bardzo proszę o odniesienie się do tej kwestii w trakcie publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

W przypadku samych prac badawczych, moje wątpliwości budzi fakt, iż wiele analiz zostało, w mojej ocenie, potraktowanych zbyt powierzchownie. Dla przykładu: indukcja senescencji była podstawowym zadaniem w ramach zaplanowanych badań. Uzyskanie modelu komórkowej senescencji było równoznaczne z uzyskaniem jedyne go modelu badawczego stosowanego w pracy. Rzetelna i skrupulatna ocena, czy rzeczywiście takim modelem się dysponuje, jest moim zdaniem kluczowa do dalszego wyciągania wniosków. W przypadku indukcji nasuwają mi się takie pytania i wątpliwości:

- str 58, fig. 7- Doktorantka pokazuje tzw. wyspę komórkową tworzącą się w wyniku potraktowania komórek doksorubicyną. Zdjęcie nie ma odniesienia do linii prawidłowej, ani nie precyzuje, czy mamy do czynienia z linią A549 czy WI38. Z technicznego punktu widzenia, przy opisie rysunku brakuje informacji o użytym powiększeniu oraz skali.
- na str. 59 Doktorantka pisze, o wykluczeniu z analizy kilku stężeń doksorubicyny (0.4, 0.8, 2 i 3 μM), z powodu obniżenia żywotności komórek poniżej 80%. Nie jest to, moim zdaniem, tak niska żywotność, żeby wykluczać takie próby z dalszych analiz, ale bardziej ciekawi mnie fakt dlaczego dla badanych linii zastosowano tak różne stężenia doksorubicyny? Wyniki testu WST-1, co zresztą

słusznie zauważa Doktorantka, są w tym przypadku mocno dyskusyjne, ponieważ paradoksalnie, bo potraktowaniu doksorubicyną obserwujemy nawet 60% wzrost żywotności komórek, co zwyczajnie nie ma tutaj sensu. Zastosowanie testu Live/Dead, połączonego z cytometrią mogłoby tu przynieść niepodważalne wyniki, jednak moim zdaniem, znów, wyniki pomiaru cytometrycznego nie zostały ani właściwie opisane ani przeanalizowane. Fig. 8 e) i f) ma pokazywać różnice w intensywności kontrastu sygnału fluorescencyjnego pomiędzy komórkami żywymi i martwymi w obu testowanych liniach. Z przykrością stwierdzam, że, moim zdaniem na tym (być może tylko na tym wybranym zdjęciu) nie ma różnic pozwalających na potwierdzenie oczekiwanych różnic.

- przy analizie testu aktywności SA- β -gal brakuje jasnych informacji liczbowych o tym, jak duża (procentowo) populację komórek udało się zaindukować. Z wykresów wynika, że jest to znaczny procent, ale nie jest to nigdzie skalkulowane i opisane.
- czy wzrost aktywności metabolicznej o 400 i 600% jest rzeczywiście tym, co obserwuje się standardowo w takich analizach? Bardzo proszę o odpowiednie referencje literaturowe dla wyjaśnienia tak dużej zmiany.
- Doktorantka pisze, że obniżony poziom lamininy B1 jest markerem senescencji komórkowej. Tymczasem w pracy zbadano poziom lamininy A i jądrowej lamininy B2, nie porównując ich poziomu do uznanego już markera. Skąd wynika takie podejście? Doktorantka stwierdza, że LMNB2 może być markerem senescencji, natomiast poziom LMNA nie ulega zmianie. Niestety, moim zdaniem, takie stwierdzenie jest nieuprawnione, dopóki nie oceni się tych zmian w odniesieniu do kontroli pozytywnej, którą w tym wypadku, z pewnością byłaby laminina B1.
- w przypadku tworzenia kompleksów liposomowych moją uwagę zwrócił bardzo niski poziom załadowania liposomu fisetyną (ok. 13%). Co mogło wpłynąć na ten fakt i co można poprawić, żeby ten poziom zwiększyć? Moim zdaniem, taki poziom, nie zapewnia właściwego stężenia substancji czynnej po dostarczeniu kompleksu do komórek.
- str. 93, Fig. 21. W przypadku badania internalizacji i pokazanych zdjęć mikroskopowych, w mojej ocenie, należałoby stwierdzić, że liposomy nie podlegają internalizacji, ponieważ te zdjęcia takiego dowodu nie dostarczają. Czy Doktorantka może tę kwestię wyjaśnić?

Mój ostatni komentarz odnosi się nie do wyników, które zostały zaprezentowane, ale do analiz, które moim, zdaniem, powinny, a nie zostały w przypadku tej pracy, wykonane. Podstawową cechą komórek senescentnych jest powrót do określonej fazy cyklu komórkowego. Doktorantka w wielu miejscach o tym fakcie pisze. Nie przeprowadzono jednak w pracy ani jednego eksperymentu pozwalającego jasno skorelować zmiany w aktywności proliferacyjnej z cyklem komórkowym. Nie przeprowadzono także testów na przechodzenie komórek w stan apoptozy. To bez wątpienia potwierdziłoby uzyskanie modelu starzenia komórkowego. Uważam także, że celowe byłoby użycie rapamycyny (o której także sama Doktorantka pisze w „Dyskusji”) jako dobrze znanego inhibitora SASP, co stanowiłoby w tym przypadku prawidłową kontrolę eksperymentu i odwrócenie fenotypu komórek zaindukowanych.

5. Podsumowanie

Reasumując, pomimo powyższych niedoskonałości, uzyskane wyniki mają potencjał aplikacyjny i naukowy. Konieczne jest jednak pogłębienie analizy danych, zwłaszcza poprzez ich opracowanie statystyczne i klarowną prezentację wyników.

W ocenianej rozprawie doktorskiej mgr Agaty Henschke na uwagę zasługuje połączenie prac z zakresu badań podstawowych z badaniami potencjalnie aplikacyjnymi. Podoba mi się zastosowanie połączenia metod chemicznych, biologicznych oraz biofizycznych. Uważam, iż rozprawa doktorska może stanowić podstawę do kontynuowania i poszerzenia badań w tej tematyce. Szczególnie cenne wydaje mi się tutaj rozwijanie wątku tworzenia liposomów niosących związki aktywne o potencjale senolitycznym i senomorficznym, które mogłyby w przyszłości wpłynąć na poprawę wyników leczenia różnych typów nowotworów.

6. Wniosek końcowy

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Agaty Henschke spełnia wszystkie warunki stawiane kandydatom w Ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742). Zwracam się zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Agaty Henschke do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 19.06.25

dr hab. Katarzyna Rolle, prof. ICHB PAN

Kierownik
Zakładu Neuroonkologii Molekularnej
ICHB PAN

dr hab. Katarzyna Rolle, prof. ICHB

