

Warszawa, 15. 08. 2022r.

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Drzał  
pt. „Wykorzystanie mikropęcherzyków tlenu do walki z hipoksją  
w guzach nowotworowych”,**

wykonanej pod kierunkiem prof. UJ dr hab. Martynty Elas, w Zakładzie Biofizyki i Biologii  
Nowotworów, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ

Powszechnie wiadomo, że dla przeżycia i proliferacji komórek nowotworowych kluczowe znaczenie ma dostępność tlenu oraz substancji odżywczych, w tym glukozy i glutaminy. Hipoksja jest jedną z cech szybko dzielących się komórek, a w przypadku komórek nowotworowych koreluje z ich inwazyjnością. Obniżone stężenie tlenu jest także przyczyną oporności nowotworów na różnego rodzaju terapie, w tym chemio-, immuno-, czy radioterapię. Podejmowane od lat różne próby podwyższania poziomu tlenu w guzach nowotworowych wciąż nie dają zadowalających wyników. Dlatego też, przeprowadzenie przez Doktorantkę szczegółowych badań mających na celu sprawdzenie czy wrażliwe na ultradźwięki mikropęcherzyki tlenu mogą uczestniczyć w utlenianiu guza nowotworowego oraz wpływać na jego wrażliwość na radioterapię, było jak najbardziej zasadne.

Przedstawiona do recenzji rozprawa została zredagowana w sposób typowy, według obowiązujących zasad, zawiera wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski końcowe, literaturę. Autorka zamieściła również wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz suplement. Całość pracy liczy 146 stron. Praca zawiera liczne tabele i ryciny, jest napisana poprawnym językiem, zwięźle ale klarownie. Na uwagę zasługuje bardzo duża ilość cytowanych prac (274), z czego wiele pochodzi z ostatnich lat.

Badania finansowane były z Projektu NCN Opus, 2015/17/B/NZ7/03005. Doświadczenia na zwierzętach prowadzono za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (uchwała 36/2016, aneksy 212/2016, 213/2016, 214/2016).

„Cele pracy” zostały sformułowane w formie sześciu pytań na które Doktorantka konsekwentnie starała się znaleźć odpowiedzi.

W obszernym „Wstępie” Autorka wykazała się dużą wiedzą na temat hipoksji. W sposób szczegółowy opisała molekularne mechanizmy tego zjawiska oraz jego wpływ na różne terapie przeciwnowotworowe. Omówiła liczne metody mające na celu zmniejszenie

hipoksji w chorobie nowotworowej, takie jak terapia tlenem hiperbarycznym czy stosowanie różnych nośników tlenu, w tym mikropęcherzyków. Dużą część tego rozdziału poświęciła na opisanie metod detekcji hipoksji. Informacje przedstawione we „Wstępie” są na tyle obszerne i interesujące, że mogłyby stanowić oddzielną publikację pogładową.

Rozdział „Materiały i metody” jest równie obszerny jak „Wstęp”. Jest to w pełni uzasadnione, gdyż Doktorantka prowadziła badania w szerokim zakresie, logicznie dążąc do uzyskania odpowiedzi na postawione pytania. Bardzo dokładnie opisała przygotowywanie badanego materiału i stosowane techniki/metody. Badania prowadziła w układach *in vitro* (mikropęcherzyki tlenu i azotu, hodowle komórek mysiego nowotworu piersi 4T1, tkanki guza, tkanki innych narządów) oraz *in vivo* (myszy, samice BALB/c). Mikropęcherzyki będące przedmiotem Jej badań były przygotowywane przez dr A. Delalande z Center for Molecular Biophysics w Orleanie (Francja). Ich wielkość Doktorantka oceniała mikroskopowo oraz przy pomocy analizatora wielkości cząstek Zetasizer Nano S, a kinetykę uwalniania tlenu za pomocą tlenometrii EPR.

Wyczerpująco opisała warunki hodowli komórkowej oraz przygotowywanie myszy do i podczas prowadzonych eksperymentów (handling przed inokulacją komórek nowotworowych, narkoza, wielodniowa obserwacja i pomiary wielkości guza, eutanazja). Mikropęcherzyki podawała zwierzętom dożylnie lub bezpośrednio do guza, z zastosowaniem lub bez działania ultradźwięków. Punktowe pomiary utlenowania guzów mierzyła przy pomocy spektroskopii EPR z wykorzystaniem sondy spinowej Oxychip, a obrazowanie poziomu tlenu w guzie z użyciem znacznika 3-CP. Obrazowanie fotoakustyczne zwierząt z największym wzrostem utlenowania w eksperymentach spektroskopowych zostało przeprowadzone w laboratorium prof. Ch. Pichon, w Orleanie ale szczegółowo opisane przez Doktorantkę. Metodę tę wykorzystano także do sprawdzenia właściwości kontrastu ultrasonograficznego mikropęcherzyków. Radioterapię myszy z największym wzrostem utlenowania w eksperymentach tlenometrycznych przeprowadzono w Instytucie Fizyki Jądrowej PAN w Krakowie i podobnie jak poprzednio, cała procedura została dokładnie opisana przez Doktorantkę.

W badaniach *in vitro* Doktorantka zastosowała i bardzo dokładnie opisała analizę poziomu białek (NRF2, GLUT1, HIF-1 $\alpha$ , N-kadheryna,  $\beta$ -katenina) w guzie techniką Western blot, oraz poziomu VEGF-A metodą ELISA. Szczegółowo przedstawiła warunki wykonanej w laboratorium prof. Ch. Pichon analizy RT-PCR poziomu mRNA czynnika HIF-1 $\alpha$  oraz trzech izoform czynnika VEGF (A, B, C). Wykonała szereg analiz histologicznych na tkankach guza, a także serca, nerek i wątroby badanych myszy. Wyczerpująco opisała

procedury barwienia immunofluorescencyjnego (detekcja naczyń, perycytów i perfuzji), hematoksyliną i eozyną (detekcja potencjalnych uszkodzeń tkanek przez mikropęcherzyki tlenu) oraz barwienie immunohistochemiczne (analiza uszkodzeń oksydacyjnych DNA, lipidów i białek w ww tkankach). Ponadto, we krwi pobranej z serca badanych zwierząt oznaczyła aktywność kinazy kreatynowej i aminotransferazy asparaginianowej, a w tkankach stężenie MDA i grup karbonylowych – wszystkie metody bardzo szczegółowo opisała.

Należy zaznaczyć, że wszystkie oznaczenia zostały przeprowadzone na właściwej statystycznie liczbie zwierząt, podzielonych na 6 grup, z uwzględnieniem prawidłowych grup kontrolnych. Ultradźwiękami traktowane były guzy po podaniu doguzowym lub dożylnym mikropęcherzyków tlenu lub azotu, a także po analogicznym podaniu roztworu buforu HEPES nasyconego tlenem lub azotem. Uznanie budzi ilość i różnorodność zastosowanych metod, a sposób ich opisanie wskazuje na doskonałe przygotowanie Doktorantki do pracy badawczej.

Rozdział „Wyniki” składa się z sześciu podrozdziałów odpowiadającym sześciu jasno sprecyzowanym „Celom szczegółowym”. Taka konsekwencja postępowania i opisu wskazuje na dojrzałość naukową Autorki. Wykorzystując liczne metody badawcze, wykonując ogromną liczbę doświadczeń Doktorantka stwierdziła, że stosowane przez Nią mikropęcherzyki tlenu są dobrym, nietoksycznym dla zdrowych tkanek nośnikiem tlenu, który uwalniają rozpadając się pod wpływem ultradźwięków w efekcie czego dochodzi do wzrostu utlenowania guza. Wykazała także, że połączenie działania mikropęcherzyków tlenu i radioterapii istotnie wzmacnia jej efektywność oraz prowadzi do zmniejszenia rozmiarów guza. Należy zwrócić uwagę na fakt, że badany przez Doktorantkę mysz nowotwór piersi wywodzący się z komórek 4T1 jest guzem przerzutowym i odpowiada IV stadium zaawansowania u kobiet. Badając wpływ mikropęcherzyków i ultradźwięków na naczynia nowotworowe, wykazała wzrost ich przepuszczalności oraz zmniejszenie pokrycia przez perycyty, efektem czego był większy rozsiew komórek nowotworowych. Chociaż taki wynik nie jest zapewne tym na jaki liczyła Autorka, jednak stwarza szerokie pole do dalszych badań. Bardzo dobrym pomysłem redakcyjnym było zamieszczanie na końcu każdego podrozdziału podsumowania uzyskanych wyników.

„Dyskusja” jest rzetelna, wyczerpująca, dobrze przeprowadzona i bardzo dobrze się czyta. Doktorantka logicznie konfrontuje własne wyniki z wynikami i spostrzeżeniami innych autorów.

„Wnioski końcowe” są sześcioma odpowiedziami na sześć wcześniej postawionych pytań/celów szczegółowych. Jest to logiczne zakończenie pracy ale w mojej ocenie są one

niewielko zbyt szczegółowe – przypominają streszczenie. Bardzo dobre, klarowne jest podsumowanie końcowe.


Cytowane w rozprawie piśmiennictwo jest starannie dobrane i jak wspomniałam wyżej, w dużej części pochodzi z ostatnich lat.

Reasumując, wysoko oceniam koncepcję pracy, zastosowane metody, wykonanie badań oraz opracowanie i interpretację uzyskanych wyników. Doktorantka z całą pewnością posiada rozległą wiedzę w dziedzinie będącej przedmiotem Jej badań. Potrafi właściwie zaplanować i przeprowadzić doświadczenia zarówno *in vivo* jak i *in vitro* wykorzystując wiele nowoczesnych, metod chemicznych, biochemicznych i histologicznych. Rozprawa stanowi oryginalne, spójne, dojrzałe dzieło wnoszące nowe treści do tak ważnego tematu jakim jest terapia nowotworów. Ponadto, przedstawione w niej wyniki stwarzają dalsze możliwości badawcze.

Uważam, że rozprawa doktorska **mgr Agnieszki Drzał pt. „Wykorzystanie mikropęcherzyków tlenu do walki z hipoksją w guzach nowotworowych”**, wykonana pod kierunkiem Pani prof. UJ, dr hab. Martynty Elas, w Zakładzie Biofizyki i Biologii Nowotworów, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim i 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. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2019r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.).

Dlatego też z pełnym przekonaniem przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie mgr Agnieszki Drzał do dalszego etapu przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę walory merytoryczne ocenianej rozprawy, szczególną staranność przeprowadzonych badań, znaczenie poznawcze badanego tematu, a także potencjalne znaczenie praktyczne uzyskanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Drzał



Prof. dr hab. Anna Barańczyk-Kuźma

emerytowany kierownik

Katedry i Zakładu Biochemii I Wydziału Lekarskiego

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego