



Politechnika Wrocławska

dr hab. Marta Kopaczyńska, Prof. ucz.
Katedra Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
Politechnika Wrocławska
50-370 Wrocław, Wybrzeże Wyspiańskiego 27
tel. 71-370-4617
marta.kopaczynska@pwr.edu.pl

Wrocław, 15.09.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

Regulacja programowanej i nieprogramowanej śmierci komórkowej w różnych liniach komórkowych

Autor rozprawy: mgr inż. Małgorzata Adamiec - Organiściok

**Promotor: dr hab. n. med. Magdalena Skonieczna, Prof. PŚ
Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki Politechniki Śląskiej**

Recenzję rozprawy doktorskiej sporządzono na prośbę Przewodniczącej Rady Dyscypliny Inżynierii Biomedycznej Politechniki Śląskiej Prof. dr hab. inż. Ewy Piętki, wyrażoną w piśmie RDIB.002.71.2023 z dnia 17 lipca 2023 roku.

Tematyka i charakter rozprawy doktorskiej

W przedłożonej rozprawie podjęto próbę identyfikacji ścieżek śmierci komórkowej oraz otrzymania systemu decyzyjnego regulacji programowanej i nieprogramowanej śmierci komórkowej. Kontrolowana śmierć komórki jest strategią na utrzymanie fizjologicznej homeostazy organizmu. Charakterystyka szlaków i mechanizmów regulacji śmierci komórkowej jest ważnym aspektem w badaniach nad nowymi terapiami genowymi. Z uwagi na dynamikę zachorowań oraz wysoką toksyczność stosowanych terapii, konieczna jest dalsza wiedza w kierunku innowacyjnych metod leczenia. Możliwość kontrolowanej indukcji lub hamowania śmierci komórkowej otwiera nowe nurty badawcze w inżynierii biomedycznej i medycynie dla ewentualnego zastosowania między innymi terapii celowanych.

Prace eksperymentalne podjęte przez Doktorantkę dotyczą głównie badania przebiegu ferroptozy w różnych liniach komórkowych, zarówno prawidłowych jak i nowotworowych. Doktorantka scharakteryzowała wpływ różnych czynników, odpowiedzialnych za indukcję lub

hamowanie ścieżek śmierci w komórkach. W eksperymentach zostały zastosowane specyficzne regulatory w celu inicjowania ferroptotycznej śmierci komórkowej, jako induktor Autorka wybrała erastynę. Dodatkowo Doktorantka badała czy modyfikacje genetyczne wpływają na zmianę wrażliwości komórek na indukcję ferroptozy. Scharakteryzowała również wpływ ko-inkubacji komórek wrażliwych z opornymi. Na podstawie zgromadzonych wyników badawczych opracowała tablice decyzyjne pomagające na określenie wrażliwości komórek na indukcję ferroptozy.

Natomiast optymalizacja decyzyjnych modeli matematycznych regulacji ścieżek śmierci komórkowej, może ułatwić wybór odpowiednich czynników indukujących uwrażliwienie komórek na stosowane leczenie w terapii genowej. Znaczenie badań podjętych z zakresu śmierci komórki może przyczynić się do zastosowania regulacji procesów śmierci komórek patologicznych w celach terapeutycznych.

Struktura oraz zawartość rozprawy doktorskiej

Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Małgorzaty Adamiec - Organiściok liczy wraz z bibliografią 145 stron. Rozprawa jest napisana w języku polskim, w postaci tradycyjnej monografii, obejmującej 10 rozdziałów, 49 rysunków, 7 tabel oraz 176 pozycji literaturowych. Rozprawa zawiera streszczenie w języku polskim oraz angielskim.

Rozdział 1 jest wprowadzeniem do zagadnień dotyczących regulowanej śmierci komórkowej, w tym apoptozie, autofagii, piroptozie i ferroptozie oraz przypadkowej śmierci komórkowej – nekrozie. Autorka omówiła podstawowe podtypy śmierci komórkowej. Ogólnie przedstawiono czynniki mające wpływ na mechanizmy prowadzące do śmierci komórki. Autorka przedstawiła również niektóre ścieżki sygnałowe, białka i receptory w niej uczestniczące.

W rozdziale 2 zaprezentowano hipotezy oraz cele badawcze przedstawionej rozprawy doktorskiej.

W rozdziale 3 przedstawiono materiał zastosowany w pracy eksperymentalnej oraz szczegółowo opisano zastosowane metody badawcze, co podkreśla umiejętności Doktorantki w obsłudze wielu technik.

Rozdział 4 jest bardzo rozbudowany. Zostały w nim zaprezentowane zgromadzone przez Doktorantkę wyniki badawcze oraz ich analiza graficzna. Rozdział 5 zawiera obszerną dyskusję wyników.

Rozdział 6 zawiera cenne i krótkie podsumowanie uzyskanych wyników.

Rozdział 7 zawiera spis tabel, chociaż nie umieszczono go w spisie treści.

Rozdział 8 zawiera spis rysunków, jego również nie umieszczono w spisie treści.

Bibliografię przedstawiono w rozdziale 9. Pozycje literaturowe liczą 176 przykładów.

W ostatnim rozdziale nr 10 opisano dorobek naukowy Autorki: artykuły naukowe, monografie oraz doniesienia konferencyjne.

Rozprawa jest starannie zredagowana, wyniki przedstawione w postaci wielu barwnych i czytelnych ilustracji, podział na rozdziały jest przemyślany i przejrzysty.

Ocena oryginalności rozprawy doktorskiej

W pracy przeprowadzono bardzo wiele eksperymentów badawczych, które zostały poprawnie omówione, a wiele uzyskanych wyników zasługuje na szczególne wyróżnienie.

Doktorantka wykazała, że prawidłowa linia keratynocytów HaCaT oraz nieadherentna linia komórkowa ostrej białaczki HL60 są odporne na indukcję ferroptozy, natomiast wykazała wrażliwość linii komórkowej czerniaka 1205Lu na indukcję śmierci komórkowej.

Dowiodła, że wzrost ekspresji kluczowych genów w ścieżce śmierci, takich jak ACSL4, TFRC oraz SLC7A11 spowodował wrażliwość komórek na indukcję ferroptozy. Natomiast wzrost ekspresji genów FSP1 oraz PROM2 dla komórek wykazujących oporność, linia HaCaT i K562, na indukcję śmierci komórkowej.

Ponadto wykazała, że komórki odporne charakteryzują się zwiększoną ekspresją w genach PROM2, GPX4 i FSP1 oraz brakiem ekspresji SLC7A11, co może definiować je jako markery oporności komórkowej. Natomiast jako markery wrażliwości komórkowej okazała się ekspresja ACSL4, TFRC, SLC7A11, TRX oraz IRP oraz brak ekspresji w genie PROM2.

Bardzo ciekawy jest fakt, że w badaniach ko-inkubacji linii komórkowych wrażliwych z opornymi wykazała szlak wzajemnej wymiany sygnałów pomiędzy tymi liniami komórkowymi. Wyniki badawcze mogą sugerować możliwość regulacji oporności lub wrażliwości kontaktujących się komórek.

Szczegółowe uwagi merytoryczne i redakcyjne

Rozprawa została dobrze zredagowana, pojawiły się jednak pewne zagadnienia, które wymagają wyjaśnienia lub omówienia.

1. Strona 31, Rozdział 1.5 Peroksydacja lipidów; niewłaściwy zapis propagacji,

powinno być: $R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$, zamiast $R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO$

2. Strona 31, Rozdział 1.5 Peroksydacja lipidów; niewłaściwy zapis procesu terminacji,

powinno być $ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow ROOR + O_2$, ponieważ w procesie terminacji powstają produkty nierodnikowe.

3. Strona 39, „SOD” niewyjaśniony skrót w wykazie skrótów.
4. Rozdział 2.2. Cel pracy, strona 44, w całości jest przeklejonym fragmentem dwóch pierwszych akapitów ze streszczenia w języku polskim ze strony 17.
5. Rozdział 2.2. Cel pracy, strona 44, w pracy zabrakło sprecyzowanych tez rozprawy doktorskiej.
6. Na rysunkach i diagramach Autorka stosuje odmiennie polskie i angielskie opisy oraz legendy
7. Strona 98, rysunek 32 dotyczący obrazowania za pomocą mikroskopii elektronowej. Opisy są niewłaściwe, C.2 to mitofagia a nie wakuolizacja, zabrakło również opisu pkt. E.1.
8. Strona 100, rysunek 34, w mikroskopii konfokalnej rejestrujemy obrazy, a nie zdjęcia.
9. Strona 102, rysunek 37 jest nieczytelny, nie widać zmian w kolumnach B i C
10. Od rysunku 39, niewłaściwe odniesienia w tekście, np. dla rysunku 39 w tekście na stronie 104 są odniesienia do rysunku 36; dla rysunku 40 odniesienia w tekście na stronie 105 są dla rysunku 37, to samo dla rysunku 41.
11. Rysunek 42 i 43 str. 110-111 czcionki w opisach na rysunku są za małe i nieczytelne
12. W bibliografii pojawiło się wiele braków np. brak rocznika lub numeru doi: cytowania [22], [26], [32], [41], [42], [46], [47], [60], [76], [88], [176] – dodatkowo brak autorów.

Proszę Doktorantkę szczególnie o rozwinięcie poniższych komentarzy:

13. Rozdział 2.2.1. Szczegółowe cele pracy, strona 45, pierwsze zdanie jest niezrozumiałe cyt. „W pracy wykonana została analiza danych, uzyskanych z własnych eksperymentów *in vitro* oraz porównano je ze zdeponowanymi w otwartych bazach danych, dla różnych ścieżek śmierci komórkowych, związanych także z udziałem w regulacji ich indukcji/przebiegu/wyciszenia metali ciężkich (Fe).” Nasuwa się jednocześnie pytanie co Doktorantka miała na myśli pisząc o wyciszeniu metali ciężkich (Fe) czy ich przebiegu?
14. Rozdział 3.5 Oznaczenie wewnątrzkomórkowego żelaza, strona 55, jak przeprowadzono pomiar stężenia żelaza? Jak kontrolowano procedurę? Jakie były błędy pomiarowe? Czy był to pomiar ilościowy? Jak Autorka interpretuje wzrost lub spadek stężenia żelaza w badanych liniach komórkowych na podstawie badań mikroskopowych? Ile powtórzeń pomiarów wykonano? Dodatkowo błąd gramatyczny „zdjęcia na mikroskopie w świetle widzialnym”
15. Strona 65, stężenie erastyny nie jest prawidłowo określone, w tekście napisano: „100 nm do 20 μ M”.
16. Rysunek 30, Indukcja ferroptozy za pomocą erastyny w komórkach HaCaT spowodowała spadek masy mitochondrialnej, natomiast w linii nowotworowej czerniaka 1205Lu

zaobserwowano wzrost masy mitochondrialnej. Jak Doktorantka interpretuje te wyniki badawcze oraz jakie techniki badawcze posłużyły do prawidłowej oceny tych obserwacji.

17. Czy w między czasie Doktorantka uzyskała wyniki sekwencjonowania produktów PCR uzyskanych na linii produkującej niefunkcjonalne białko GPX4?

Chciałabym podkreślić, że przedstawione przeze mnie pytania, zagadnienia do dyskusji oraz błędy językowe gramatyczne i interpunkcyjne, które pojawiły się w rozprawie, nie są uwagami krytycznymi i absolutnie nie wpływają na ogólną ocenę rozprawy i dorobku naukowego Doktorantki.

Wnioski końcowe

Doktorantka zrealizowała założone cele badań, stosując przy tym bogaty warsztat badawczy i eksperymentalny, co świadczy o odpowiedniej wiedzy w dziedzinie nauk inżynieryjno - technicznych w dyscyplinie inżynieria biomedyczna.

Dorobek naukowy Autorki obejmuje w sumie 42 publikacje, w tym 9 artykułów naukowych z Listy Filadelfijskiej, o łącznym IF 27,39. Doktorantka jest współautorem 3 monografii oraz 13 doniesień konferencyjnych, które prezentowała podczas krajowych oraz międzynarodowych konferencji. Do jej publikacji zaliczone są również rozdziały w monografiach oraz artykuły w czasopismach spoza Listy Filadelfijskiej. H-index Autorki według bazy Web of Science wynosi 3 oraz łącznie 33 cytowania, według Scholar wynosi 4 oraz łącznie 50 cytowań.

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez *Ustawę* z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (j.t. Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Mając zatem na uwadze osiągnięte wyniki, dorobek naukowy Doktorantki oraz obowiązujące przepisy o stopniach i tytułach naukowych, wnoszę do Rady Dyscypliny Inżynierii Biomedycznej Politechniki Śląskiej o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z uwagi na oryginalność otrzymanych wyników, ich wysoki potencjał badawczy oraz odpowiedni dorobek Doktorantki wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Adamiec – Organiściok.

Dr hab. Marta Kopaczyńska, Prof. ucz.

