



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



Krajowy Naukowy
Ośrodek Wiedzący

dr hab. inż. Barbara Jachimska, prof. IKiFP PAN
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera
Polska Akademia Nauk

Kraków 19.08.2019

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Kamińskiej

pt. „Molecular characteristics of platelet and urinary extracellular vesicles and their possible applications in nanomedicine”

Przedstawiona praca doktorska mgr inż. Agnieszki Kamińskiej pt. „Molecular characteristics of platelet and urinary extracellular vesicles and their possible applications in nanomedicine” została wykonana na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem dr hab. n. med. Ewy Łucji Stępień prof. UJ.

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki (extracellular vesicles EVs,) są heterogenną populacją pęcherzyków, uwalnianych przez komórki zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. W zależności od pochodzenia, wielkości i pełnionej funkcji EVs dzieli się na: egzosomy, mikropęcherzyki i ciała apoptotyczne. Struktury tego typu są przedmiotem coraz większego zainteresowania ze względu na istotną rolę jaką pełnią w komunikacji międzykomórkowej, oraz jako naturalny nośnik licznych białek, lipidów, a także kwasów nukleinowych.

Potwierdzeniem, iż podjęta tematyka badawcza znajduje się w ważnym nurcie nowoczesnych trendów diagnostycznych, jest fakt powstania w 2011 roku międzynarodowego stowarzyszenia *The International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV), które wydaje czasopismo *Journal of Extracellular Vesicles* o IF=11,00. Otrzymywanie w nieinwazyjny sposób swoistych białkowych markerów zmian chorobowych może być użytecznym narzędziem w diagnostyce klinicznej, monitorowaniu przebiegu choroby czy prowadzeniu terapii. Obecnie wciąż dużym wyzwaniem jest zagadnienie opracowania metodologii pozyskiwania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych do diagnostyki klinicznej.

Zasadniczym celem rozprawy było określenie właściwości fizykochemicznych oraz składu molekularnego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w kontekście ich zastosowania w diagnostyce cukrzycy oraz jej powikłań.

Przedstawiona rozprawa doktorska obejmuje łącznie 110 stron i składa się z 9 rozdziałów obejmujących: wprowadzenie dotyczące aktualnego stanu wiedzy o pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (20 stron), opis metod badawczych zastosowanych w pracy (12 stron), opracowanie wyników badań własnych (19 stron), dyskusję (4 strony), podsumowanie, streszczenie, dorobek własny oraz literaturę (173 pozycje). Rozprawa jest bogato ilustrowana rysunkami (32) oraz tabelami (17), co ułatwia czytelnikowi zrozumienie przedstawionych metod badawczych oraz analizę wyników. Od strony edycyjnej praca przygotowana jest bardzo dobrze.

W części doświadczalnej autorka przedstawia techniki analityczne zastosowane do charakterystyki fizykochemicznej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych takie jak: dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), śledzenie trajektorii ruchu cząstek (NTA), przestrajalny czujnik zmian rezystancji (TRPS), ruchliwość elektroforetyczna, skaningowa i transmisyjna mikroskopia elektronowa (SEM, TEM). Do analizy składu molekularnego pęcherzyków

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351



zastosowano spektroskopię Ramana (RS), spektroskopię mas (MALDI-TOF/TOF-MS) oraz analizę profilu mikroRNA (NGS). Taka różnorodność technik badawczych pozwala wielopłaszczyznowo analizować korelacje pomiędzy własnościami pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, a ich składem molekularnym.

Do badań doktorantka pozyskała próbki pacjentów chorych na cukrzycę o różnym stopniu zaawansowania przewlekłej choroby nerek. Sumarycznie w opracowaniu badań doktorantka bazowała na populacji 60 pacjentów.

W rozdziale 4 i 5 autorka przedstawia metodologię otrzymywania mikropecherzyków zarówno z moczu jak i krwi oraz różnorodny sposób przygotowania próbek zależnie od zastosowanej metody pomiarowej. Rozdział 6 poświęcony jest analizie statystycznej prowadzonych badań. Wyniki badań przeprowadzonych przez autorkę zostały zestawione w rozdziale 7. Badania obejmują między innymi określenie morfologii EVs z zastosowaniem TEM oraz SEM, które to badania potwierdzają wysoką heterogeniczność badanych układów (wielkość w zakresie 20-220nm). Ponadto autorka określa rozkład wielkości badanych próbek z zastosowaniem metod TRPS, DLS oraz NTA.

Autorka wykonała analizę zmian zeta potencjału dla UEVs oraz PEVs. Punkt izoelektryczny (i.e.p) dla UEVs występuje w pH=2,67 w przypadku kontrolnej próbki oraz pH=2,69 dla pacjentów z cukrzycą. Dla PMVs i.e.p jest trochę wyższy w zakresie pH 3-3,4. Wszystkie badane próbki wykazują ujemny ładunek, a maksymalna wartość zeta potencjału jest na poziomie 10-11mV. Należałoby przy tej analizie podać informacje o sile jonowej roztworu, pozwoli to na porównanie wyników z danymi literaturowymi.

Proteomikę stosuje się w celu poszukiwania różnic w profilach białkowych osób zdrowych i chorych. Zastosowanie odpowiednich metod analitycznych umożliwia identyfikację pojedynczych białek stanowiących potencjalne markery diagnostyczne. Analiza proteomiczna profili białkowych przedstawiona na diagramie Venna wskazuje na istotną różnicę w składzie próbek od pacjentów z grupy C, UD oraz CD. Szczególnie różnice są widoczne w przypadku próbek pacjentów z grupy CD, które posiadają w swoim składzie aż 49 unikalne białka, gdy dla grupy C oraz UD tylko 4. Tak szerokie spektrum białek pokazuje, iż analiza tych układów nie jest prosta, zwłaszcza że są one jednocześnie indykátorem zmian chorobowych zachodzących w organizmie. Dlatego tylko analiza statystyczna wielu zmiennych, charakteryzujących profile białkowe, pozwala na identyfikację grup białek, dla których zmiany ekspresji mają znaczenie zarówno w diagnostyce, ocenie ryzyka, długookresowym monitorowaniu czy też prognostyce choroby.

Przeprowadzone badania proteomiczne wykazały na występowanie potencjalnych markerów diagnostycznych. Występowanie podokaliksyny u pacjentów z grupy CD i UD wiąże się z dysfunkcją podocytów tj. komórek blaszki trzewnej kłębuszka nerkowego. Podokaliksyna wchodzi w skład glikokaliksu pokrywającego podocyty. Uszkodzenie powyższych białek doprowadza do znacznego zmniejszenia powierzchni filtracyjnej kłębuszków nerkowych. Podocyty nie mają zdolności proliferacyjnych, co oznacza, że ich dysfunkcja prowadzi do nieodwracalnego uszkodzenia nerek.

W próbkach pacjentów z grupy CD stwierdzono również obecność galektyny-3, która jest biomarkerem kardiologicznym, związanym z zapaleniem i włóknieniem mięśnia sercowego. Podwyższony poziom tego białka jest obserwowany w wielu stanach patologicznych przebiegających z włóknieniem tkanek takich jak włóknienie mięśnia sercowego, marskość wątroby, włóknienie płuc, zapalenie trzustki czy niewydolność nerek.



Autorka wykazała ciekawą korelację pomiędzy stężeniem uromoduliny obecnej na powierzchni pęcherzyków a poziomem wskaźnika przesączania kłębuszkowego GFR. Według danych literaturowych uromodulina (glikoproteina syntetyzowana wyłącznie w nerkach) może być uzupełnieniem tradycyjnych markerów nerkowych (takich jak kreatyniny, cystatyny C, GFR), szczególnie we wczesnych stadiach niewydolności nerek, kiedy tradycyjne markery nie wykazują jeszcze zmian. Nasuwa się pytanie jaki jest mechanizm regulacji stężenia uromoduliny w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych oraz czy znana jest zmienność osobnicza poziomu wyjściowego?

Do analizy składu molekularnego UEVs, ze szczególnym uwzględnieniem białek, DNA, kwasów nukleinowych czy lipidów, zastosowano spektroskopię Ramana. Zestawione widma Ramana dla próbek pacjentów z grup C, CD i UD (rys. 25) wskazują na istotne zmiany występujące w dwóch obszarach widma, w zakresie $600-900\text{ cm}^{-1}$ zawierającego pasma od cholesterolu oraz kwasu 3-hydroksymasłowego oraz w zakresie $1630-1760\text{ cm}^{-1}$ w którym występuje pasmo amidowe I pozwalające na analizę drugorzędowej struktury białek. Widma Ramana (rys.29) dla pacjentów z cukrzycowym uszkodzeniem nerek porównano stosując współczynnik korelacji Pearsona (korelacja pomiędzy biochemicznymi parametrami układu a AUC). Dla DNA i kwasów nukleinowych otrzymano wyższy poziom AUC, natomiast dla białek niższy poziom AUC w przypadku pacjentów z grupy 3-5 w porównaniu do próbek kontrolnych. Jak podsumowuje autorka spektroskopia Ramana jest jak najbardziej przydatnym narzędziem do badania składu molekularnego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Sugerowałabym autorce rozszerzenie badań z zastosowaniem spektroskopii FTIR, która daje wyniki komplementarne do spektroskopii Ramana. Zwłaszcza, że przy tak złożonym składzie molekularnym analizowanych próbek pozwoliłoby to na dokładniejszą ich ocenę.

Badania własne kończy analiza mikroRNA, która pozwoliła na wytypowanie kilku potencjalnych markerów cukrzycy między innymi: miR-126-3p oraz miR-455-3p. W rozdziale 8 mamy przedstawioną dyskusję do przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej badań. Kilka zagadnień omawianych przez autorkę wymaga doprecyzowania.

Należy zwrócić uwagę, że stężenie UVs jest parametrem układu a nie stanowi własności fizycznej. Zgodzę się natomiast z autorką, że ilość mikropęcherzyków w badanym układzie może być indykatorem zmian chorobowych, na przykład uszkodzenia pracy nerek powodując hiperfiltrację.

Autorka ustosunkowała się do analiz wielkości EVe, reasumując, iż metoda TRPS jest najbardziej przydatna w analizie wielkości pęcherzyków. Niestety nie mogę się zgodzić z tym stanowiskiem. Dla próbek przedstawionych na rys. 19 mamy dobrą zgodność pomiędzy metodą DLS oraz NTA. Wyniki przedstawione na rys. 20 charakteryzują się gorszą zgodnością. Autorka porównała wyniki z obu metod biorąc do analizy zależność ilości cząstek od ich wielkości dla NTA oraz sygnał intensywności rozpraszania światła od wielkości cząsteczki dla DLS. Czy autorka próbowała porównać wyniki biorąc pod uwagę analizę rozkładu w zależności od objętości cząsteczki, a nie intensywności rozpraszania? Dla próbek bardzo heterogenicznych taka analiza w przypadku metody DLS daje lepsze rozkłady. Ponadto porównując rozkład wielkości z różnych metod można zauważyć, iż w przypadku zastosowania metody TRPS następuje odcięcie rozkładu dla cząstek mniejszych niż 95 nm, na których występowanie wskazują inne zastosowane metody.

W ocenie przewlekłej choroby nerek mamy dwie składowe stanu dysfunkcji: wydolności wydalniczej nerek (na podstawie wskaźnika przesączania kłębuszkowego GFR) oraz funkcji



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



Krajowy Naukowy
Ośrodek Wiodący

kłębuszków nerkowych (na podstawie poziomu albuminy). Ten drugi aspekt w pracy został omówiony marginalnie.

Tabela 1 zamieszczona na str. 8 powinna zawierać informacje o markerach znajdujących się na powierzchni pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. W przypadku mikropęcherzyków na powierzchni obecne są integryny, selektyny oraz CD40.

Pracę doktorską kończy zwięzłe podsumowanie otrzymanych wyników pomiarowych zawarte w rozdziale 9. Praca generalnie napisana jest w sposób zrozumiały dla czytelnika, jednak w tekście zdarzają się nieliczne omyłki. Powyższe uwagi nie zmieniają mojej pozytywnej opinii na temat recenzowanej pracy doktorskiej. Przedstawione przez doktorantkę badania mają dużą wartość poznawczą oraz aplikacyjną. Otrzymane wyniki badawcze pozwoliły w pełni osiągnąć autorce cel rozprawy dotyczący opracowania metodologii pozyskiwania i charakterystyki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pacjentów chorych na cukrzycę. Autorka wykazała, że umie sformułować cele badawcze i zaplanować eksperymenty w celu ich osiągnięcia. Wybór szerokiej gamy metod eksperymentalnych dowodzi, iż mgr inż. Agnieszka Kamińska jest dojrzałym naukowcem zasługującym na stopień naukowy doktora nauk fizycznych.

Dorobek mgr inż. Agnieszki Kamińskiej obejmuje 5 publikacji. Wszystkie prace są anglojęzyczne i opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym o IF od 2,8 do 8,7 (łącznie IF = 24,9). Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż w dwóch publikacjach mgr inż. Agnieszka Kamińska jest głównym autorem, a w jednej autorem korespondencyjnym. Ponadto autorka brała udział w opracowaniu 3 zgłoszeń patentowych. Posiada również spory dorobek konferencyjny, w ciągu realizacji pracy doktorskiej uczestniczyła łącznie w 14 konferencjach krajowych oraz zagranicznych.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca doktorska przedstawia istotną wartość pod względem poznawczym i aplikacyjnym, a tym samym posiada elementy nowości w zakresie dziedziny nauk fizycznych. W związku z tym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Kamińskiej pt. „Molecular characteristics of platelet and urinary extracellular vesicles and their possible applications in nanomedicine” spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim 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 65/2003 poz. 595). Wobec powyższego wnioskuję do Rady Naukowej Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Kamińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, uznając nowatorskie podejście do otrzymywania biomarkerów stanów chorobowych opartych na pęcherzykach zewnątrzkomórkowych oraz ze względu na ich wysoki potencjał aplikacyjny wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr inż. Agnieszki Kamińskiej.

dr hab. inż. Barbara Jachimska, prof. IKiFP PAN