

PROF. DR HAB. N. MED. TOMASZ PIOTROWSKI
KATEDRA I ZAKŁAD ELEKTRODIOLOGII, UNIwersYTET MEDYCZNY W POZNANIU
ZAKŁAD FIZYKI MEDYCZNEJ, WIELKOPOLSKIE CENTRUM ONKOLOGII W POZNANIU

Poznań 18.02.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Hanieh Karimi zatytułowanej:
Characterization of melanoma cell spheroids by means of imaging techniques and positron annihilation lifetime spectroscopy.

Rozprawa doktorska Pani mgr Hanieh Karimi „*Characterization of melanoma cell spheroids by means of imaging techniques and positron annihilation lifetime spectroscopy*” spełnia kryteria Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz 882), dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Fizycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, o dopuszczenie Doktorantki Hanieh Karimi do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego - doktora nauk fizycznych.

Uzasadnienie

Jeśli chodzi o kultury in vitro, to sferoidalne (inne określenia: trójwymiarowe, 3D) kultury kolonii komórkowych są modelem, który jest najbliższy warunkom naturalnym. W organizmie, komórki organizują się przestrzennie. Przestrzennie zorganizowane są w tkanki i dalej, np. w organy. Sygnały do i od komórek przechodzą w sposób przestrzennie zorganizowany, podobnie jak dyfuzja płynów wraz z substancjami w nich rozpuszczonymi. Dlatego też kolonie 3D w odpowiedzi na stymulację, mają reakcję bardziej zbliżoną do tej w organizmie, niż kultury 2D. Należy jednak pamiętać, że aby jak najlepiej „odwzorować naturę”, kolonie 3D powinny być prawidłowo namnożone.

Autorka postanowiła poddać ocenie przydatność wykorzystania różnych technik - biochemicznych, obrazowych i spektroskopowych w celu charakterystyki, wyhodowanych przez nią, trójwymiarowych kolonii komórkowych czerniaka.

Czerniak jest złośliwym nowotworem wywodzącym się z neuroektodermalnych komórek melanocytarnych. W związku z tym najczęstszym miejscem występowania tego nowotworu

jest skóra. Czerniak w zaawansowanym stadium może dawać przerzuty do wszystkich organów. Trójwymiarowe kolonie komórkowe czerniaka, w odróżnieniu do kolonii komórek prawidłowych (np. skóry), nie wymagają w celu ich założenia bio-rusztowania. Stąd też metoda kropli wiszącej użyta przez doktorantkę jest prawidłowa. W celu utworzenia sferoidalnych kolonii czerniaka, doktorantka wykorzystwała dwie linie komórkowe – pierwotną i przerzutową, obie pozyskane z Banku Komórek w Tybindze w Niemczech. Stosując metodę kropli wiszącej uzyskała różne gęstości kolonii w obu liniach komórkowych. Procedura namnażania kolonii została opisana szczegółowo i nie budzi moich zastrzeżeń.

W zasadniczej części pracy, doktorantka przytacza uzyskane przez siebie wyniki które dotyczą odpowiednio:

1. Oceny struktury przestrzennej, wzrostu i żywotności sferoidalnych kolonii czerniaka przy użyciu metod biochemicznych i obrazowych,
2. Oceny dystrybucji produktów odżywczych w tychże sferoidach przy użyciu technik bioluminescencyjnych oraz,
3. Określenia czasu życia pozytonium w komórkach czerniaka o różnym stopniu złośliwości.

Przed przytoczeniem uzyskanych wyników należy podkreślić, że podstawy teoretyczne jak i „metodologia użytkowa” każdej z wykorzystanych metod została przez doktorantkę szczegółowo i co ważniejsze – prawidłowo opisana.

W oparciu o metody mikroskopowe autorka potwierdziła, że wielkość sferoid zależy od początkowej liczby sedacji i wzrasta wraz z czasem hodowli. Odpowiednio sferoidy uzyskane z linii przerzutowej charakteryzowały się znacząco większą średnicą i krągłością (dla każdej gęstości sedacji) niż sferoidy uzyskane z linii komórek pierwotnych. Analiza żywotności poszczególnych grup komórek w sferoidach potwierdziła, że największą żywotnością cechują się komórki zlokalizowane na powierzchni sferoid (warstwa proliferacyjna) a najmniejszą w jądrze (centrum) sferoid. Należy nadmienić, że przytaczane w tej recenzji (wybrane) wyniki są olbrzymim uogólnieniem odkryć autorki, opisanych niezmiernie szczegółowo i wyczerpująco. O ile metody mikroskopowe są powszechnie stosowane w tego typu analizach, to wykorzystanie zoptymalizowanej przez doktorantkę metody mikro tomograficznej (dedykowanej pierwotnie strukturom znacznie gęstszym) budzi mój nieukrywany zachwyt. Wyniki obrazowania mikro-TK wykazały jednoznacznie, że kolonie 3D utworzone z linii przerzutowej mają postać dużych i zwartych sferoid, charakteryzujących się wyraźnymi

krańcościami o dobrze zaznaczonej powierzchni. Odróżnia to je od kolonii z linii komórek pierwotnych posiadających strukturę rozproszoną, składających się z wielu niewielkich kulistych grup komórek.

Kolejnym obszarem poddanym analizie była ocena dystrybucji produktów odżywczych w sferoidach. Na podstawie tej analizy doktorantka wykazała, że laboratoryjne układy 3D zadowalająco odzwierciedlają wielowarstwową strukturę rzeczywistych guzów charakteryzujących się zróżnicowanym wychwytem glukozy i tlenu. Jak wykazała doktorantka, fenomen ten można obserwować na obrazach mikroskopowych analizowanych sferoid).

O ile pierwsze dwie części badawcze pracy odbieram jako swoiste studium właściwości kolonii sferoidowych komórek czerniaka przy użyciu znanych i stosowanych metod - wyjątek stanowi tu, co chciałbym jeszcze raz podkreślić, opracowana przez autorkę metodyka wykorzystania obrazowania mikrotomograficznego; to w ostatniej części badawczej doktorantka postanowiła zbadać użyteczność pozytonium jako swoistego markera umożliwiającego różnicowanie stopnia złośliwości komórek czerniaka. Część ta jest innowacyjna zarówno z perspektywy konstrukcji badanego układu jak i badań nad możliwościami potencjalnego narzędzia, czyli pozytonium.

Doktorantka postawiła hipotezę, że różnica między stopniem złośliwości pierwotnych i przerzutowych linii komórkowych czerniaka (odpowiednio, WM115 i WM266-4), występująca na poziomie fizjologii komórki, znajduje odzwierciedlenie na poziomie nanomolekularnym, co może być sondowane za pomocą pozytonium.

Pozytonium to quasi-stabilny układ zbudowany z pozytonu i elektronu. Może on powstać w przestrzeniach wewnątrzcząsteczkowych ośrodka biologicznego, na przykład podczas diagnostyki PET. Ze względu na wzajemne ustawienie spinów pozytonu i elektronu rozróżnia się stan trypletowy (tzw. ortopozytonium) oraz stan singletowy (tzw. parapozytonium). Ortopozytonium rozpada się ze średnim czasem życia 142 ns (w próżni) na trzy fotony, zaś parapozytonium, rozpada się na dwa fotony ze średnim czasem życia 125 ps (w próżni). Czasy życia mogą się różnić w ośrodkach innych niż próżnia, np. średni czas życia ortopozytonium w wodzie wynosi 1.8 ns. Co więcej, ortopozytonium powstałe w ośrodku biologicznym może oddziaływać z elektronami molekuł ośrodka, co w efekcie prowadzi do anihilacji pozytonu i powstania dwóch fotonów. Z kolei parapozytonium może oddziaływać z cząsteczkami tlenu, co prowadzi też do anihilacji i powstania dwóch fotonów.

Metoda PALS (spektroskopia czasu życia pozytonów) służy do badania różnych właściwości materiałów, takich jak rozmiary wolnych objętości czy aktywność chemiczna. Próbnikiem używanym w tej technice jest właśnie pozyton, który anihiluje z jednym z elektronów badanego ośrodka. Właśnie ta metoda została wykorzystana przez doktorantkę do oceny czy pozytonium jest dobrym markerem do oceny i różnicowania sferoidalnych kultur komórek czerniaka względem ich złośliwości. Metodologia eksperymentu przedstawionego w części trzeciej została zaprezentowana szczegółowo i przejrzysto. Uzyskane wyniki potwierdziły, że różnice na poziomie fizjologii między komórkami czerniaka o różnym stopniu złośliwości znajdują odzwierciedlenie na poziomie molekularnym, sondowanym przez pozytonium. Odpowiednio, doktorantka wykazała, że:

1. Linie komórek przerzutowych formowały kolonie sferoid, które były bardziej sferyczne i zagęszczone niż dla linii komórek pierwotnych;
2. Większą proliferacją charakteryzowały się linie komórek przerzutowych (istotność statystyczna odnotowana dla ósmego dnia namnażania);
3. Stosowanie PALS nie wpływa w sposób istotny na żywotność kolonii sferoidalnych;
4. Komórki sferoid linii przerzutowych były mniejsze niż sferoid linii pierwotnej;
5. Komórki sferoid linii pierwotnych miały dłuższy czas podwojenia niż linii przerzutowych;
6. **Czas życia ortopozytonium w sferoidach linii komórek przerzutowych był krótszy niż dla sferoid linii pierwotnych;**
7. **Obie linie komórkowe charakteryzowały się skróceniem czasu życia ortopozytonium wraz ze wzrostem czasu namnażania.**

Badania przeprowadzone przez doktorantkę są pionierskie. Stąd też uzyskane wyniki nie są potwierdzeniem już zbadanych prawideł a odkryciem, które może być inspiracją dla innych badaczy.

Praca napisana przez Panią mgr Karimi jest napisana w języku angielskim, w mojej opinii poprawnie (*jestem osobą bez wykształcenia lingwistycznego, nie jestem native speakerem*). Nieliczne błędy edytorskie, na przykład: 0.125 ns zamiast 0.125 ps (str 16), zwroty typu „*jak pokazuje rycina 9.9*” umieszczone w opisie ryciny (str 40), skracanie pełnej nazwy linii WM266-4 do WM266 (wiele miejsc w pracy), nie umniejszają wagi pracy. Co więcej, w mojej opinii praca nie posiada błędów merytorycznych.

Struktura pracy jest typowa dla prac doświadczalnych. Napisana została łącznie na 94 stronach maszynopisu. Objętości poszczególnych rozdziałów jak i ich kolejność są prawidłowe. Bibliografia liczy 131 pozycji – aktualnych i prawidłowo dobranych.

Biorąc pod uwagę powyższe, uważam, że praca spełnia wszystkie wymagania postawione przed rozprawą doktorską. Co więcej, jest ona w mojej opinii pracą ponad przeciętną. Wnoszę więc o wyróżnienie pracy.

Pytania do doktorantki

Praca jest kompletna i napisana bardzo przejrzysto. Czytając ją wielokrotnie nie znalazłem miejsca/zagadnienia, o które musiałbym dopytać doktorantkę w celu rozjaśnienia głównego ciągu myślowego dysertacji. Stąd też chciałbym zadać doktorantce pytanie poza głównym nurtem jej badań i pytanie o przyszłość projektu. Są to odpowiednio:

1. W badaniach mikrotomograficznych doktorantka wykorzystywała układ wykorzystujący wiązkę RTG. Chciałbym się dowiedzieć czy w badaniu doktorantki byłoby możliwe wykorzystanie mikro-TK w oparciu o wiązkę synchrotronową (zakładam hipotetyczną dostępność) i jeśli tak to czym różniłyby się uzyskane wyniki.
2. Jakie kolejne badania należy poczynić, aby przybliżyć się do etapu wdrożenia klinicznego zaproponowanej metody. Proszę pominąć, oczywiste zagadnienia legislacyjno-prawne.

Z wyrazami szacunku

prof. dr hab. Tomasz Piotrowski

Katedra i Zakład Elektrodziologii UMB
Tomasz Piotrowski