

Wiel 20.04.17  
M. Podhorska-Okołów

Uniw. Med. Wrocław  
WYDZIAŁ LEKARSKI  
Prodziekan ds. Nauki  
prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okołów

**II Katedra i Klinika Ginekologii**

**Uniwersytetu Medycznego w Lublinie**

**Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. n. med. Tomasz Rechberger**

20-954 Lublin, ul. Jaczewskiego 8; Tel. +48/81 7244 686, Fax. +48/81 7244 849

---

Lublin 15/4/2017

Ocena dysertacji doktorskiej mgr inż. Niny Justyny Rembiałkowskiej

p.t. „Ocena skuteczności elektrochemioterapii w warunkach *in vitro*”

wykonanej pod kierunkiem naukowym

**dr hab. n. med. Jolanty Saczko, prof. nadz.**

w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego

im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Metodę elektroporacji, jak pisze Doktorantka we wstępie, definiuje się jako „...przejściową utratę ciągłości i wzrost przepuszczalności błony komórkowej pod wpływem działania intensywnego pola elektrycznego..”. Dotyczy to w szczególności sytuacji, kiedy zwiększenie przewodnictwa błony oraz powstanie elektroporów /dodatkowych ścieżek przewodzących/ pozwala na swobodny transport do wnętrza komórki substancji niskocząsteczkowych, w szczególności chemioterapeutyków. Pierwsze badania kliniczne z zastosowaniem elektroporacji do wprowadzania cytostatyków do guza nowotworowego /ECT – elektrochemioterapia/ opisano 16 lat temu w Instytucie Gustave-Roussy w Villejuif /Francja/, zaś do chwili obecnej metoda ta znajduje już zastosowanie w onkologii klinicznej. W Polsce pierwszy zabieg z zastosowaniem ECT w pacjenta z przerzutami czerniaka na udzie i w pachwinie

przeprowadzono 29 października w 2009 we Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu. ECT znajduje zastosowanie w leczeniu wybranych rodzajów nowotworów u człowieka /czerniak skóry, rak podstawnokomórkowy skóry/, jakkolwiek opisano użycie metody także w leczeniu nawrotowego raka piersi, przerzutów raka jelita grubego do wątroby czy nawet przerzutów nowotworowych do kości. W leczeniu postaci nawrotowych raka piersi, ECT znajduje również zastosowania, zaś badania opublikowane do chwili obecnej, chociaż na ograniczonej liczbie pacjentek, są obiecujące.

W związku z powyższym, podjęcie trudu badań nad znaczeniem wpływu chemioterapii modyfikowanej elektroporacją na zmiany zachodzące w ludzkich komórkach gruczolakoraka gruczołu piersiowego w warunkach *in vitro* uważam za zasadne oraz bardzo interesujące. W badaniach zastosowano ogólnie dostępne cytostatyki /doksorubicynę i bleomycynę/ w dwóch liniach komórkowych, MCF-7/WT i MCF-7/DOX, odpowiednio wrażliwej i odpornej na działanie doksorubicyny. Poddano także szczegółowej analizie „...zagadnienia dotyczące stresu oksydacyjnego, nekrozy oraz apoptozy, ekspresji białek szoku termicznego, lokalizacji cytostatyków w komórkach oraz ich ultrastruktury po zastosowaniu chemioterapii i chemioterapii wspomaganiej elektroporacją”.

Przedstawiony do recenzji manuskrypt składa się aż ze 179 stron starannie przygotowanego wydruku komputerowego z szeregiem rysunków, fotografii i tabel. Poniżej pozwolę sobie, w formie skróconej, poddać ocenie treść recenzowanej rozprawy.

Na początku pracy, Autorka przedstawiła spis zastosowanych skrótów /strony 11-12/ tłumacząc je w oryginalnej pisowni.

W rozbudowanym wstępie dysertacji /strony 13-46/, szczegółowo i ze znanstwem Autorka omówiła historię i zastosowanie kliniczne elektroporacji, prezentując fotografię dostępnych w naszym kraju urządzeń. Bardzo ciekawym, w ujęciu Recenzenta, jest rozdział 1.3 prezentujący wyczerpująco kliniczne zastosowanie ECT /elektrochemioterapii/, zwracając uwagę na pierwotne i przerzutowe guzy nowotworowe

mogące być leczone wyżej wymienioną metodą. Mechanizmy działania elektrochemioterapii, z uwzględnieniem rodzajów śmierci komórek /apoptoza, nekroza, autofagia/ zaprezentowano na stronach 25-29. Autorka opisała rodzaje kliniczne nowotworów gruczołu piersiowego, metody ich leczenia z uwzględnieniem różnych schematów polichemioterapii. Zastosowanie ECT w terapii nowotworów gruczołu piersiowego, jak również opis oporności wielolekowej, są podsumowaniem danych literaturowych, zebranych przez Doktorantkę. Rozdziały obejmujące zastosowanie ECT w terapii ludzkich nowotworów, tak guzów pierwotnych jak również przerzutów nowotworowych i wznów, mogą zostać opublikowane jako ciekawe, niezależne, prace poglądowe.

W pracy zastosowano dwie linie komórkowe, MCF-7/WT i MCF-7/DOX, otrzymane z Zakładu Biologii Nowotworów, Centrum Onkologii Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach. Autorka opisała szczegółowo zastosowane cytostatyki /doksorubicynę i bleomycynę/, porównując w Tabeli 3.1 oba leki. Mgr inż. Nina Justyna Rembiałkowska zaprezentowała metodykę doświadczeń z fotografią elektroporatora EMC 830 wraz z kuwetami /Fot.3.3/ podając zastosowane warunki elektroporacji, następnie opisała stężenia chemioterapeutyków w doświadczeniach modyfikowanych elektroporacją. Bardzo szczegółowo opisała wszystkie doświadczenia na stronach 55-64, co pozwala w pełni na ich powtórzenie. Rozdział „Materiały i Metody” kończy podrozdział „Analiza statystyczna” prezentujące zastosowane metody oceny statystycznej uzyskanych wyników.

Wyniki badań /strony 135-65 dysertacji/ są najbardziej rozbudowana częścią rozprawy. Warto podkreślić, iż „...wraz ze wzrostem natężenia elektrycznego podczas stosowania impulsów elektrycznych maleje przeżywalność komórek.” /strona 69/. Wynik badań przedstawiane są tak w formie opisowej jak również w postaci czytelnych, kolorowych rycin. Warto nadmienić, iż linia komórkowa MCF-7/DOX jest bardziej wrażliwa na działanie elektroporacji, zaś dla linii komórkowej MCF-7/WT znaczny wzrost cytotoksyczności był obserwowany po zastosowaniu doksorubicyny wspomaganą elektroporacją /strony 79-80/. Na kolejnych stronach Autorka zaprezentowała badania

cytometryczne metodą podwójnego barwienia jodkiem propidyny i aneksyny V rodzaju śmierci komórek nowotworowych. Lokalizacja dokсорubicyny w komórkach została opisana na stronach 89-105, wyniki zaprezentowano na licznych kolorowych fotografiach. Na kolejnych stronach przedstawiono analizę ultrastruktury komórek, stopień peroksydacji lipidów, określenie stężenia grup tiolowych oraz immunohistochemiczną ocenę ekspresji wybranych białek: HSP-27 i HSP-70. Wyniki badań immunohistochemicznych zaprezentowano w postaci wybarwionych, czytelnych fotografii. Na stronie 134 Autorka zaprezentowała badania statystyczne, Recenzent nie rozumie dlaczego ten podrozdział znajduje się właśnie w tym miejscu?

W dyskusji, na 13 stronach dysertacji, Autorka szczegółowo przeanalizowała uzyskane dane, odnosząc wyniki do możliwego szerokiego zastosowania klinicznego elektroporacji wraz ze standardową chemioterapią w leczeniu raków piersi u człowieka. Szczególnie istotne jest iż nie tylko przeanalizowała wpływ zastosowanych dawek dwóch leków cytostatycznych /bleomycyny i dokсорubicyny/ wraz z elektroporacją na linie komórkowe raka piersi ale również poddała dyskusji znaczenie rodzaju śmierci komórkowej, zmian ultrastrukturalnych w obrębie komórek oraz rolę stresu oksydacyjnego indukowanego chemioterapią z/bez elektroporacji. Bardzo ciekawą obserwacją jest fakt, iż „...Wyniki prezentowanej pracy wykazały znaczący spadek przeżywalności komórek wrażliwych oraz opornych po zastosowaniu chemioterapii wspomaganą elektroporacją względem samej chemioterapii czy samej elektroporacji.”. Zmiany w obrębie komórek po elektroporacji obejmują wzrost przepuszczalności błon, zmieniając stężenia odpowiednich jonów i cytostatyków. Dochodzi do wzrostu reaktywnych form tlenu, zaburzeń w strukturach mitochondriów oraz wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. W związku z powyższym trafna jest uwaga iż „...zjawisko elektroporacji w kombinacji z cytostatykami jest złożone i zależy od wielu czynników.”.

Wnioski z niniejszej dysertacji, w liczbie 7, zawarte są na stronie 148 pracy. W odczuciu Recenzenta najbardziej wartościowym jest wniosek 1, wskazujący na zwiększenie efektywności transportu badanych chemioterapeutyków do komórek po

elektroporacji, co skutkuje spadkiem przeżywalności linii komórkowych raka piersi. Jakkolwiek wnioski są nadmiernie rozbudowane, liczba uzyskanych wyników uzasadnia taka ich liczbę w recenzowanej dysertacji.

Streszczenia /w języku polskim i angielskim/ umieszczone są przed spisem piśmiennictwa. W opinii Recenzenta, streszczenia powinny zawierać także wyniki i wnioski z prezentowanej pracy. Spis piśmiennictwa (strony 151-172), wykaz rysunków (strony 173-175), wykaz fotografii (strony 175-179) i wykaz tabel (strona 179) znajdują się na końcu dysertacji. Autorka zastosowała niestandardową metodą cytowania prac, albowiem w manuskrypcie prace są cytowane według nazwiska pierwszego Autora i daty publikacji /bez Współautorów/, ale w spisie piśmiennictwa są one ponumerowane.

Podsumowując, zaprezentowana mi do oceny dysertacja doktorska mgr inż. Niny Justyny Rembiałkowskiej wskazuje na złożoność zastosowanej metody elektroporacji w kombinacji z wybranymi cytostatykami w modelu doświadczalnym raka gruczołu piersiowego. Transponowanie wyników badań doświadczalnych na ludzi nie jest proste, szczególnie iż w modelu ludzkim „...tkanka nowotworowa podlega kontroli układu odpornościowego, posiada własne naczynia krwionośne i limfatyczne, powstają kontakty przestrzenne pomiędzy poszczególnymi komórkami, wewnątrz tkanek dochodzi również do zmian pH, nierównomiernego dostarczania substancji odżywczych oraz tlenu”. Tym niemniej wyniki żmudnych i czasochłonnych doświadczeń Doktorantki są bardzo obiecujące i mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu ludzkich nowotworów wykazujących lekooporność. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, ich znakomitą prezentację oraz nowatorski charakter badań wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Niny Justyny Rembiałkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki /Dz. U. Nr. 65, poz. 595, z późn. zm./. Wyróżnienie pracy stosowną nagrodą będzie ukoronowaniem bardzo wysokiego poziomu merytorycznego dysertacji. Recenzent ma także nadzieję na

publikację w najbliższej przyszłości wyników w czasopismach naukowych z „listy  
filadelfijskiej”.

2097081 Prof. dr hab. n. med. Andrzej Semczuk  
Specjalista ginekologii i położnictwa  
tel. 0801 715 700  
*Andrzej Semczuk*

*15.4.2017r. Dublin*