

Wrocław, 07.04.2017

Prof. n. tech. dr hab. n. fiz. inż. lek. med. Halina Podbielska
Katedra Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
Politechnika Wroclawska
50-370 Wrocław
Wybrzeże Wyspiańskiego 27

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu DZIEKANAT WYDZIAŁU LEKARSKIEGO	
wpl. dnia	12-04-2017
L. dz. DL	1362/2017
Znak sprawy DL	

Recenzja rozprawy doktorskiej

Ocena skuteczności elektrochemioterapii w warunkach in vitro

Autor rozprawy: mgr inż. Nina Rembiałkowska

Promotor: dr hab. Jolanta Saczko prof. nadzw.

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Recenzję rozprawy doktorskiej sporządzono na prośbę Dziekana Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu Pani prof. dr hab. Małgorzaty Sobieszkańskiej, wyrażoną w piśmie DL/N/371/17 z dnia 30.01.2017, w związku z powierzeniem obowiązków recenzenta przez Radę Naukową Wydziału Lekarskiego (Uchwała Rady Nr 6/01/2017).

Dane na temat rozprawy

Recenzowana praca doktorska Pani mgr inż. Niny Rembiałkowskiej liczy 179 stron. Pracę podzielono na 10 Części, chociaż są to raczej oddzielne rozdziały. Wyczerpujący Wstęp, prezentowany jest na 46 stronach i dotyczy podsumowania wiedzy na temat elektroporacji, elektrochemioterapii i nowotworów gruczołu piersiowego, w tym metod leczenia. Należy więc uznać, że Doktorantka wykazała, iż posiada ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie naukowej, w której ubiega się o nadanie stopnia doktora, zgodnie z *Art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi nowelizacjami*, stwierdzającym iż, rozprawa doktorska powinna „wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej”.

Część 2. CEL i założenia pracy, została potraktowana bardzo skrótowo, co jest w pewnym sensie uzasadnione zakresem badań, jednakże pracy by na pewno zyskała, gdyby Autorka w tej części nawiązała bardziej do zagadnień omawianych we Wstępie.

Część 3. i 4. rozprawy poświęcone są odpowiednio omówieniu materiałów, metod i prezentacji otrzymanych wyników. Po czym następują Dyskusja i Wnioski (Część 5. i 6.).

Część 7. i 8., to zgodnie z wymaganiami ustawowymi, odpowiednio streszczenia w języku polskim i angielskim. Streszczenia charakteryzują krótko cel rozprawy, jak i zawierają podsumowanie przeprowadzonych badań, jednakże brak jest wzmianki na temat osiągniętych wyników czy wniosków wynikających z tak rozlegle prowadzonych badań. Pominięcie tego aspektu, skutkuje tym, że streszczenia są w pewnym stopniu niekompletne. Szkoda, że Doktorantka nie scharakteryzowała krótko w streszczeniu swoich własnych osiągnięć, które przecież są nietuzinkowe.

Bibliografia omawiana w rozprawie jest trafnie dobrana, wyjątkowo bogata i liczy 253 pozycje, w tym 3 współautorskie doniesienia Doktorantki.

Ocena aktualności zagadnień poruszanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej

W ostatnich latach obserwujemy niezwykle rozwój w dziedzinie biomedycznych badań podstawowych, jak i w poszukiwaniu małoinwazyjnych procedur terapeutycznych i diagnostycznych. Wiele prowadzonych obecnie na świecie projektów badawczych związanych jest z badaniami, dotyczącymi struktur komórkowych i subkomórkowych. Badania tego typu, w skali mikro- i nano, są w polu zainteresowania współczesnej inżynierii biomedycznej, medycyny eksperymentalnej, nauk chemicznych i biochemii, biologii molekularnej, a także wkraczają do praktyk klinicznych; i to zarówno w diagnostyce, jak i w terapii. Nowe i rozwijające się techniki są przedmiotem badań podstawowych, jak i klinicznych, a jak wiadomo, nowe terapie muszą być najpierw przetestowane w warunkach *in vitro*.

Recenzowana rozprawa Pani Justyny Rembiałkowskiej wpisuje się więc w nurt badań związanych z oceną efektywności terapii przeciwnowotworowych w warunkach *in vitro*. Praca dotyczy aktualnego i ważnego aspektu, a mianowicie skutecznego postępowania terapeutycznego, między innymi w przypadku lekoopornych odmian raka sutka.

Doktorantka postawiła sobie za zadanie przetestowanie wspomagania działania leków przeciwnowotworowych za pomocą elektroporacji. Nie jest to temat szeroko prezentowany w literaturze. Według danych w bazie PubMed pierwsze publikacje z tego zakresu ukazały się na początku lat 90., od tego czasu stale rośnie liczba rocznie publikowanych prac, nie przekraczając jednak kilkadziesiąt rocznie (82 publikacje w bazie PubMed w 2016). Jak więc widać, badania Doktorantki są aktualne i ważne dla rozwoju tej dyscypliny.

Ocena rozprawy i osiągnięć stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora

Głównym celem rozprawy, jaki wyznaczyła sobie Doktorantka, było zbadanie wpływu elektrochemioterapii na komórki gruczolakoraka sutka. Dobór materiału badawczego jest jak najbardziej uzasadniony, gdyż jest to jeden z najczęściej występujących nowotworów. Badania prowadzone były na liniach komórkowych MCF-7/WT i MCF-7/DOX. Ta ostatnia charakteryzuje się niewrażliwością na powszechnie stosowany w leczeniu raka piersi cytostatyk: doksorubicynę. Badania miały za zadanie porównanie efektu chemioterapii i chemioterapii połączonej z elektroporacją, przy czym analizowano zjawiska stresu oksydacyjnego, nekrozy i apoptozy, białka szoku cieplnego oraz lokalizację cytostatyków w komórkach w przypadku oddziaływania dwóch leków przeciwnowotworowych: doksorubicyny i bleomycyny. W pracy zabrakło trochę wyjaśnienia, dlaczego testowano bleomycynę, która nie jest powszechnie stosowanym lekiem w terapii raka sutka.

Doktorantka opisała w pracy bardzo dokładnie metodykę badań, jak i wykorzystywany materiał badawczy. Miejscami praca sprawia wrażenie bardzo dokładnego raportu laboratoryjnego, co należy zaliczyć raczej do zalet, gdyż świadczy to o bardzo rzetelnym opanowaniu warsztatu badawczego. Do ceny skutków elektrochemioterapii wykorzystała m.in. metodę cytometrii przepływowej FACS (*fluorescence activated cell sorting*). W pracy w niektórych miejscach błędnie została nazwana cystometrią, które to pojęcie związane jest z badaniami urologicznymi (badanie urodynamiczne służące m.in. do diagnostyki przyczyn nietrzymania moczu). Lokalizację cytostatyków w komórkach badała za pomocą mikroskopii konfokalnej.

O ile opisy badań są bardzo dokładne, to prezentacja zastosowanych metod statystycznych jest dość powierzchowna. Niejasne jest, jak sprawdzono, czy analizowane zmienne miały rozkład normalny, ani nie wytłumaczono, dlaczego można traktować próby jako niezależne. Nie wyjaśniono też, dlaczego przyjęto dwa różne poziomy istotności.

Część 4. Pracy poświęcona jest omówieniu otrzymanych wyników. Najpierw Autorka omówiła wyniki badań cytometrycznych, używając przy tym sformułowania „elektropermeabilizacja błon komórkowych”. Nie podała jednak ścisłej definicji tego określenia, ani przy omawianiu wyników, ani w części poświęconej metodom. Chodzi, jak wiadomo o zwiększoną przepuszczalność, ale niejasne jest czy mamy tu do czynienia ze zjawiskiem odwracalnym czy trwałym uszkodzeniem.

Następnie Doktorantka wyznaczała minimalną dawkę chemoterapeutyków, niepowodującą efektu cytotoksycznego. Do dalszych badań wybrała średnie dawki, jednakże

przydałoby się w przypadku bleomycyny wyjaśnienie, dlaczego zdecydowano się na dawki 30 i 300 nM i jak się one odnoszą do osiągniętych *in vivo* stężeń terapeutycznych.

W następnej części Doktorantka relacjonuje wyniki badań po zastosowaniu elektroporacji, chemioterapii i elektrochemioterapii. Wyniki te są zilustrowane diagramami słupkowymi i omówione w tekście, a wyniki dotyczące analizy rodzaju śmierci komórek za pomocą cytometrii przepływowej zilustrowano spot-diagramami. Jednakże diagramy z analizy cytometrycznej nie są zbyt dogłębnie objaśnione. Oznaczenia na rysunkach nie są wytłumaczone pod rysunkami, ani w tekście, co sprawia, że dość trudno śledzić czytelnikowi tok rozumowania.

W rozdziale dotyczącym lokalizacji doksorubicyny w komórkach, Autorka rzetelnie relacjonuje przeprowadzone badania, których wyniki zostały bogato zilustrowane za pomocą obrazów mikroskopii konfokalnej. Nie podaje jednak danych na temat badań nad bleomycyną. Podobnie potraktowane zostały pozostałe rozdziały, dotyczące badań ultrastrukturalnych za pomocą mikroskopu elektronowego, badań stresu oksydacyjnego (peroksydacja lipidów), analizy uszkodzenia białek komórkowych i ekspresji białek szoku termicznego. Trudno się zorientować z lektury tekstu rozprawy, które badania i dlaczego zostały przeprowadzone dla jednego, a które dla obu cytostatyków.

Podsumowanie osiągniętych wyników Doktorantka zaprezentowała w Części 5., a mianowicie w Dyskusji, którą wzbogaciła licznymi odniesieniami do badań innych Autorów, a w Części 6. - Wnioski - wymieniła kolejno swoje osiągnięcia. Dyskusję przeprowadziła rzetelnie, wykazując przy tym duże rozeznanie w uprawianej tematyce badawczej.

Do najważniejszych wyników osiągniętych przez Panią Ninę Rembiałkowską należy zaliczyć wykazanie, że zastosowanie elektroporacji zwiększa wrażliwość na chemioterapeutyki, również w komórkach opornych na doksorubicynę i to nawet przy mniejszych dawkach.

Rozprawa jest w miarę poprawnie zredagowana, aczkolwiek zawiera liczne błędy interpunkcyjne (najczęściej brak przecinka przed *ale*, *a*, lub innych zdaniach podrzędnie złożonych), jak i językowe (przykładowo niejasne sformułowanie we Wniosku nr 2: *odpowieź komórek na stosowane metody... korelują pomiędzy...* - pomijając błąd gramatyczny, chodziło chyba raczej o: *oscylują*), przez co czytanie jest nieco utrudnione. (Prawdę mówiąc, trudności w czytaniu pracy wynikały również z tego, że pracę wydrukowano na wysokiej jakości papierze o dużej gramaturze, a sposób oprawy nie ułatwiał otwarcia pracy na określonej stronie).

Wnioski końcowe

Rozprawa została sumiennie przygotowana, a otrzymane wyniki są ważne z punktu widzenia przyszłych zastosowań, w tym klinicznych. Wspomniane powyżej usterki nie wpływają na ogólną pozytywną ocenę pracy. Dobrze by jednak było, żeby Doktorantka ustosunkowała się do wspomnianych w recenzji uwag podczas obrony.

Reasumując, stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wymagania wspomniane w regulujących te kwestie dokumentach (*Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz.U. Nr 65 z dnia 16 kwietnia 2003 r., poz. 595 z późn. zm. oraz odpowiednie Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora*).

Mając zatem na uwadze osiągnięte wyniki oraz obowiązujące przepisy o stopniach i tytułach naukowych, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego o dopuszczenie Pani mgr inż. Niny Rembiałkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. n. tech. dr hab. n. fiz. inż. lek. med. Halina Podbielska