

Recenzja pracy doktorskiej pani mgr Joanny Weźgowiec, zatytułowanej „*The influence of electroporation on selected anti-tumor agents applied in human breast cancer cells*”

Przedstawiona do recenzji praca zawiera streszczenie w języku angielskim (2 strony), streszczenie w języku polskim (23 strony), oraz w języku angielskim część literaturową (22 strony) i eksperymentalną (86 stron). Łącznie praca liczy 170 stron. Na początku pracy znajduje się dwustronicowy spis stosowanych skrótów. Odnośniki literaturowe obejmują łącznie 178 pozycji. Badania opisane w pracy wykonane zostały pod kierownictwem naukowym dr hab. inż. Małgorzaty Kotulskiej, prof. nadzw., oraz dr inż. Julity Kulbackiej.

Część literaturowa pracy zawiera wprowadzenie do zagadnień związanych ze zjawiskiem elektroporacji błon lipidowych, omawia mechanizm zjawiska i czynniki wpływające na ten proces. W dalszej części opisane są praktyczne zastosowania odwracalnej elektroporacji w medycynie, takie jak elektrochemioterapia, elektrotransfer genów, a także zastosowania elektroporacji nieodwracalnej. Autorka również dokonała przeglądu komercyjnie dostępnego sprzętu, stosowanego przy elektroporacji komórek. Jeden z rozdziałów poświęcony jest też perspektywom rozwoju tej techniki w medycynie. Autorka zauważa również, że ciągle nie do końca jest wyjaśniony mechanizm powstawania porów w błonach komórkowych pod wpływem silnego pola elektrycznego i ich biologiczne skutki. Dużo uwagi w części literaturowej Autorka poświęca terapii fotodynamicznej, jej zastosowaniu, mechanizmom fotoindukowanych procesów, oraz substancjom stosowanym w praktyce klinicznej w tych procesach.

W części eksperymentalnej pracy Autorka postawiła następujące hipotezy naukowe:

1. Zastosowanie elektroporacji w komórkach raka piersi, wrażliwych i odpornych na standardową chemioterapię, może być alternatywną metodą na wprowadzanie leków przeciwnowotworowych do komórki i zwiększenie efektu cytotoksyczności.

2. Zastosowanie elektroporacji umożliwi zmniejszenie dawki leku i czasu jego oddziaływania na komórki raka piersi bez zmniejszenia jego skuteczności.

Badania zostały przeprowadzone w warunkach *in vitro*. Wykorzystane zostały ludzkie linie komórek gruczolakoraka gruczołu sutkowego MCF-7/WT oraz linie komórek odpornych na dokсорubicynę MCF-7/DX. Dodatkowo w badaniach nad elektroporacją jako układ modelowy zastosowano komórki jajnika chomika chińskiego CHO-WWT, charakteryzujące się niską ekspresją kanałów jonowych. W badaniach wykorzystane zostały trzy związki chemiczne o właściwościach cytotoksycznych:

- Photofrin, wykorzystywany klinicznie jako fotouczulacz,
- cyjaninę IR-775, dostępny komercyjnie związek światłoczuły, nie stosowany dotąd w terapii fotodynamicznej,
- bleomycynę, która jest cytostatykiem stosowanym w elektrochemioterapii.

Przebadany został wpływ poszczególnych substancji na badane komórki w różnych kombinacjach z naświetlaniem i elektroporacją. Do oceny efektów zastosowania poszczególnych procedur Autorka wykorzystwała szereg standardowych testów witalności komórek, takich jak analiza transportu molekularnego metodami mikroskopii fluorescencyjnej i cytometrii przepływowej, analiza zmian morfologicznych metodą mikroskopii fluorescencyjnej, analiza śmierci komórek metodą mikroskopii świetlnej, testy metodami spektrofotometrycznymi takimi jak ocena integralności błon komórkowych (LDHe), ocena aktywności mitochondriów (MTT, XTT), ocena aktywności lizosomów (NR), ocena zdolności komórek do syntezy białek (SRB). Zastosowano też analizę immunocytochemiczną wpływu reakcji na układ antyoksydacyjny metodą mikroskopii świetlnej (ekspresja GST) oraz analizę immunocytochemiczną wpływu na oporność lekową metodą mikroskopii świetlnej (ekspresja transporterów błonowych MDR1 i MRP7).

Elektroporacja prowadzona była przy użyciu urządzenia typu ECM830, BTX Harvard Apparatus, Syngen Biotech oraz urządzenia typu Betatech S20, L'union. Obydwa urządzenia pozwalają na zaprogramowanie na wyjściu ciągu prostokątnych impulsów napięciowych o określonym napięciu, czasie trwania i przerwach między impulsami.

Wyniki przeprowadzonych testów przedstawione zostały w postaci szeregu wykresów słupkowych, obrazów mikroskopowych oraz zebrane zostały w tabelach. Wykonana została statystyczna obróbka wyników z zastosowaniem testu t-Studenta.

Dyskusja uzyskanych wyników przedstawiona została na 17 stronach ciągłego tekstu, bez wydzielenia wyraźnych części i omawianych zagadnień. Powoduje to, że ta część pracy jest

dość trudna do przeanalizowania, szczególnie gdy nie jest się specjalistą z biochemii, tak jak ja. Jednak w następnym rozdziale, na podstawie przeprowadzonej dyskusji, przedstawione zostały bardzo jasno sformułowane wnioski, opisane w dziewięciu punktach, wykazujące, że połączenie reakcji fotodynamicznej i chemioterapii z elektroporacją zwiększyło cytotoksyczny efekt w ludzkich komórkach gruczolakoraka gruczołu sutkowego. W niektórych kombinacjach zastosowanie elektroporacji zwiększyło skuteczność leków nawet kilkadziesiąt razy.

W pracy można zauważyć bardzo logiczny dobór eksperymentów, pozwalający na stwierdzenie, jaki jest rzeczywisty wpływ elektroporacji na obserwowane efekty cytotoksyczne związane z ułatwionym transportem leków przez pory generowane w membranach. Duża liczba różnorodnych testów daje pełny obraz skutków zastosowanych procedur.

Praca doktorska przedstawiona mi do oceny na pewno będzie jeszcze wielokrotnie wykorzystywana przez osoby interesujące się tą tematyką, specjalizujące się w różnych dziedzinach – biofizyce, biochemii, medycynie, aparaturze medycznej. Mimo, że w części eksperymentalnej pracy wyniki są precyzyjnie i w pełni przedstawione, to w części wprowadzającej w te zagadnienia czuję pewien niedosyt bardziej szczegółowych opisów, fotografii czy rysunków, w prosty sposób ilustrujących zastosowane techniki, procedury i testy. Niewiele by to zwiększyło objętość rozprawy, a znacznie by ułatwiło pełne zrozumienie pracy dla osób nie będących specjalistami w tych zagadnieniach, bez sięgania po dodatkową literaturę.

Eksperymenty dotyczące elektroporacji komórek przeprowadzane były przy użyciu dwóch różnych urządzeń. Przy elektroporatorze typu ECM 830 stosowane były aluminiowe elektrody. Zastosowanie takich elektrod budzi moje wątpliwości z dwóch powodów. Aluminium bardzo łatwo ulega pasywacji i rezystancja granicy faz metal/roztwór znacząco zwiększa się, co może powodować istotne spadki napięcia na tej granicy. W efekcie gradient potencjału w roztworze jest mniejszy, niż wynika z odległości między elektrodami i amplitudy impulsów. W kolejnych eksperymentach gradient ten może dodatkowo zmieniać się wskutek zmian rezystancji na granicy faz. Rzeczywisty gradient potencjału podczas elektroporacji można określić za pomocą dwóch dodatkowych elektrod umieszczonych między elektrodami elektroporatora, podłączonymi np. do cyfrowego oscyloskopu. Druga wątpliwość co do zastosowania aluminiowych elektrod wynika z procesów elektrodowych zachodzących na elektrodach podczas przepływu prądu. Na dodatniej elektrodzie następuje utlenianie aluminium i tworzenie z ortofosforanami(V) trudno rozpuszczalnego osadu. W efekcie prowadzi to do

zmniejszenia stężenia fosforanów w roztworze i pojawienia się w nim nowego składnika – zawiesiny ortofosforanu(V) glinu oraz do zmiany pH roztworu. Procesy te są mi znane z prowadzonych przeze mnie badań dotyczących elektrokoagulacji ścieków, których celem było właśnie usuwanie fosforanów w postaci ortofosforanu(V) glinu. Określenie, na ile wspomniane wyżej czynniki mogą wpływać na elektroporację komórek i dalsze procesy zachodzące w komórkach, wymaga dodatkowych eksperymentów. Nie zmienia to jednak znaczenia uzyskanych przez doktorantkę wyników i ich zastosowania w medycynie. Z pracy nie wynika, czy elektrody te były dostarczone przez producenta sprzętu do elektroporacji, czy wykonane w ramach badań przedstawionych w pracy doktorskiej. Z dużym prawdopodobieństwem mogę jednak przyjąć, że moje uwagi skierowane są raczej do producenta sprzętu niż do Autorki pracy.

Przy kilku rysunkach użyte zostały niezręczne sformułowania „electroporation at 0 V/cm” lub „electrochemotherapy with bleomycin at 0 V/cm”, ponieważ w tych przypadkach elektroporacja nie występuje.

Na stronie 48 znajduje się informacja dotycząca „stałoprądowej metody chronopotencjometrycznej do pomiaru pojemności dwuwarstwowych membran lipidowych”. Do zdania tego wkradła się drobna nieścisłość, ponieważ metoda chronopotencjometryczna wykorzystywana jest w badaniach zjawiska elektroporacji w dwuwarstwowych membranach lipidowych, a do pomiarów pojemności membran służy inny układ w tym urządzeniu, specjalnie zaprojektowany do tego celu, niezależny od technik chronopotencjometrycznych.

Na uznanie zasługuje bardzo starannie wykonana strona edycyjna przedstawionej rozprawy. Wszystkie rysunki i fotografie są czytelne i nie zauważyłem w nich żadnych błędów, chociaż cyfrowa obróbka niektórych obrazów mikroskopowych mogłaby poprawić ich jakość. Praca zawiera znikomą liczbę uchybień natury językowej i edytorskiej, zupełnie nie wpływających na wysoką wartość przedstawionej do recenzji pracy.

Autorka recenzowanej pracy doktorskiej mgr Joanna Weźgowiec wykazała dużą dojrzałość i dociekliwość badawczą, a jej praca wyróżnia się oryginalnością i precyzją w rozwiązaniu nakreślonego celu badań. Przedstawione w pracy wyniki wykazują ogrom wykonanej pracy i ich wysoką wartość. Liczę na to, że mgr Joanna Weźgowiec po uzyskaniu stopnia naukowego doktora będzie kontynuować rozpoczęte badania. Doświadczenie zdobyte podczas tych badań powinno być wykorzystane w dalszej pracy przy tej tematyce. Wyniki są bardzo obiecujące i konieczne jest szybkie przeniesienie ich do praktyki medycznej. Tematyka pracy jest niezwykle ważna, a wyniki przedstawionych badań dają nadzieję na ratowanie zdrowia i życia wielu ludziom dotkniętym chorobami nowotworowymi.

Na podstawie analizy dokumentacji dostarczonej razem z rozprawą doktorską mogę stwierdzić, że w stosunkowo krótkim czasie Autorka wykazała się bardzo dużą aktywnością naukową i organizacyjną, m.in:

- jest współautorką trzech prac dotyczących zagadnień podjętych w pracy doktorskiej, opublikowanych w czasopismach z Listy Filadelfijskiej, o współczynnikach IF około 2,5,
- jest współautorką rozdziału „Electroporation in modern oncology” w książce „Electrically active materials for medical devices”, London Imperial College Press,
- jest autorką rozdziału „Electroporation: theory and practice” w książce „Postępy inżynierii biomedycznej”, Wydawnictwo Uniwersytet Rzeszowski,
- prezentowała zagadnienia dotyczące elektroporacji i wyniki swoich badań na licznych konferencjach naukowych w kraju i za granicą w postaci czterech komunikatów ustnych i siedmiu posterów,
- uczestniczyła w kilku stażach, warsztatach i szkoleniach, aktywnie współpracuje z kilkoma laboratoriami w kraju i za granicą,
- prowadzone przez Autorkę badania były dziewięć razy dofinansowywane z różnych źródeł, w tym uzyskany został przez Autorkę grant NCN Preludium,
- osiągnięcia naukowe, organizacyjne i dydaktyczne Autorki docenione zostały w postaci ośmiu nagród, wyróżnień i stypendiów.

W ramach oceny formalnej pracy doktorskiej mgr Joanny Weźgowiec stwierdzam, że:

- a) tytuł odpowiada treści pracy,
- b) spis treści posiada wymaganą wartość informacyjną,
- c) streszczenie pracy doktorskiej (23 strony) napisane jest poprawną polszczyzną, prawie bez wyrażen żargonowych, natomiast jakość języka angielskiego, w którym została napisana praca, została określona przez filologa anglistę o specjalności translatorskiej jako „świetna”,
- d) dokonano zwięzłego i treściwego przeglądu dobrze dobranej literatury, obejmującej 170 pozycji, pochodzących renomowanych czasopism naukowych, w znacznej większości najnowszych, wydanych po roku 2000, jak też nielicznych starszych, do których dostęp nie zawsze jest łatwy. Dodatkowo w części literaturowej wykorzystane zostały informacje pochodzące z ośmiu stron internetowych,
- e) cel i zakres badań sformułowano jasno i przekonująco,
- f) praca zawiera 21 tabel i 89 rysunków (wykresy i obrazy mikroskopowe), natomiast streszczenie pracy napisane w języku polskim zawiera 2 tabele i 15 rysunków,

g) część doświadczalna pracy kończy się szczegółową dyskusją wyników i jasno przedstawionymi wnioskami, wykazującymi osiągnięcie celu badań.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że praca doktorska mgr Joanny Weźgowiec zatytułowana „*The influence of electroporation on selected anti-tumor agents applied in human breast cancer cells*” spełnia wszelkie wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, wraz z późniejszymi zmianami. W związku z powyższym stwierdzeniem składam wniosek o dopuszczenie Autorki pracy pani mgr Joanny Weźgowiec do publicznej obrony. Składam też wniosek do Rady Wydziału o wyróżnienie tej pracy.

Kalinowski