



*Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz*  
*Katedra Biofizyki Molekularnej*  
*Uniwersytetu Łódzkiego*

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Weźgowiec pt.  
„ The influence of electroporation on selected anti-tumor agents applied in  
human breast cancer cells”**

Jak pokonać nowotwór? Pytanie to jest wyzwaniem intelektualnym dla badacza, a przekłada się na problem życia i śmierci dla pacjenta, a miliardowe wydatki w skali państwa. To, że szanse wyleczenia choroby nowotworowej ciągle rosną, nie jest wynikiem jednego przełomowego odkrycia, ale mozolnego postępu w zrozumieniu mechanizmów powstawania i rozwoju nowotworów i mnogości pomysłów na nowe rodzaje terapii. W tym frapującym i bardzo ważnym nurcie badań osadzone są badania mgr inż. Joanny Weźgowiec podsumowane w Jej rozprawie doktorskiej.

Jednym z ogólnych problemów terapii nowotworowej jest problem skutecznego wprowadzenia leku do wnętrza komórki tak, by osiągnąć jego cytotoksyczne stężenie. Elektroporacja, pozwalająca na przełamanie bariery przenikalności błony plazmatycznej, wydaje się być techniką bardzo obiecującą pod tym względem. Za cel swojej rozprawy doktorskiej mgr inż. J. Weźgowiec postawiła sobie ocenę skuteczności elektroporacji na skuteczność działania związków o aktywności przeciwnowotworowej na komórki raka piersi, w tym na komórki z wykształconą opornością wielolekową.

Rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Weźgowiec napisana jest w języku angielskim i poprzedzona obszernym (22-stronicowym) streszczeniem w języku polskim. We Wstępie (*Introduction*) Autorka zwięźle omawia błony komórkowe, mechanizm elektroporacji, jej warunki progowe i stadia tego procesu, czynniki wpływające na elektroporację i zastosowana medyczne elektroporacji – elektrochemioterapię, elektrotransfer genów i elektroporację nieodwracalną, a także aspekty technologiczne i perspektywy zastosowań tej techniki. W dalszej części przedstawia

terapię fotodynamiczną – jej zasady fizyczne, najczęściej stosowane fotouczulacze i zastosowanie tej techniki. Końcowa część Wstępu zawiera omówienie raka piersi i jego leczenia, zjawiska oporności wielolekowej, w tym transporterów wielolekowych z nadrodziny ABC i metody pokonywania oporności wielolekowej.

Przedstawiając Cele badań (*Objectives of the study*) Doktorantka przedstawia dwie hipotezy robocze: (i) zastosowanie elektroporacji umożliwi zmniejszenie stężenia i czasu oddziaływania leków podawanych do komórek nowotworowych bez zmniejszenia ich skuteczności oraz (ii) tworzenie alternatywnych dróg transportu leku do wnętrza komórki za pomocą elektroporacji przyczyni się do osłabienia efektów zjawiska oporności wielolekowej w komórkach opornych na standardową chemioterapię.

Materiały i metody (*Materials and methods*) przedstawione są należycie szczegółowo. Stosowane techniki obejmowały procedury elektroporacji komórek, efektu fotodynamicznego i elektro-fotodynamicznego na poziomie komórkowym, a metody analityczne m. in. cytometrię przepływową, oznaczenie żywotności komórek testami wykorzystującymi MTT, XTT, dehydrogenazę mleczanową, czerwień obojętną i sulforodaminę B, metody immunocytochemiczne i mikroskopię fluorescencyjną dla oceny poziomu i lokalizacji wewnątrzkomórkowej białek. Zastanawiam się nad celowością rozdzielenia podrozdziału 3.9 *Methods of analysis* na przedstawienie zasad metod (3.9.1) i opis stosowanych procedur (3.9.2), ale respektuję ten pomysł Autorki rozprawy.

Obiektem badań były komórki gruczolakoraka gruczołu sutkowego MCF-7 i wyprowadzona z nich linia wrażliwa na doksorubicynę (MCF-7/DX) oraz komórki jajnika chomika chińskiego CHO-WTT o niskiej ekspresji kanałów jonowych, a związkami badanymi były dwa fotouczulacze: Photofrin, IR-775 i bleomycyna. Szkoda nieco, że nie zostały pokazane struktury chemiczne tych związków (choć obecnie znalezienie ich w internecie to kwestia kilku sekund).

Przeprowadzone badania zaowocowały wieloma oryginalnymi i interesującymi wynikami; chcę odnieść się tylko do niektórych z nich. Doktorantce udało się dobrać takie parametry elektroporacji (natężenie pola elektrycznego, liczba impulsów, czas ich trwania i częstość) nie powodujące znaczącego obniżenia żywotności komórek, które w nieobecności leków nie zmieniały morfologii komórek i nie obniżały w znaczącym stopniu ich żywotności oraz warunki reakcji fotodynamicznej i ekspozycji na bleomycynę spełniające analogiczny warunek. Mam

drobne zastrzeżenie dotyczące doświadczeń z bleomycyną: na Rycinach 4.9 i 4.10 pokazane są wyniki badań wpływu bleomycyny na przeżywalność komórek MCF-7 i MCF-7/DX. Zależność kończy się na stężeniu 706,44 nM, a w dalszych badaniach włączających elektroporację stosowane jest stężenie 1  $\mu$ M. Ta zależność winna być zbadana w zakresie stężeń obejmującym stężenie 1  $\mu$ M. Elektroporacja wzmagala pobieranie fotouczulaczy przez komórki, co jest interesującą obserwacją ze względu na hydrofobowy charakter tych związków (mogłoby się wydawać, że elektroporacja nie jest potrzebna dla wspomżenia ich wnikania do komórek), oraz bleomycyny (czego należało oczekiwać ze względu na hydrofilowy charakter tego związku). Elektroporacja zwiększała cytotoksyczność leków ocenianą kilkoma niezależnymi metodami, zarówno w komórkach MCF-7, jak i w komórkach MCF-7/DX. Wskazuje to zatem, że elektroporacja jest skuteczna także w odniesieniu do komórek przejawiających oporność wielolekową i może być jedną z dróg pokonania tej oporności. Wyniki te są bardzo obiecujące i kolejnym etapem badań winny być próby zastosowań elektroporacji w połączeniu z chemioterapią i terapią fotodynamiczną *in vivo*. Interesujące są też obserwacje dotyczące podniesienia poziomu S-transferazy glutationowej w komórkach MCF-7 i MCF-7/DX poddanych połączonemu działaniu elektroporacji i reakcji fotodynamicznej oraz podwyższenia poziomu białek oporności wielolekowej MDR1 i MDR7 w komórkach poddanych elektroporacji i działaniu bleomycyny, choć wskazują na potencjalne ograniczenia skuteczności terapii obejmującej elektroporację.

Doktorantka nie badała uwalniania wewnątrzkomórkowych substancji indukowanego przez elektroporację. Można zastanawiać się, czy ten efekt (np. uwalnianie glutationu) nie przyczynia się do zwiększenia efektywności działania leków.

Dobrze napisana 17-stronicowa dyskusja (*Discussion*) konfrontuje wyniki własne z danymi piśmiennictwa. W oparciu o uzyskane wyniki Autorka rozprawy formułuje 9 wniosków (*Conclusions*), z których część ma raczej charakter podsumowania wyników, więc zatytułowanie tego fragmentu rozprawy jako *Summary and Conclusions* byłoby może bezpieczniejsze.

Mam kilka drobnych uwag polemicznych, głównie pod adresem edycji rozprawy. Z pewnością hydrofilowe główki fosfolipidów nie są główkami „triglicynowymi” (s. 47). Nadrodzina transporterów ABC liczy dużo więcej niż 40 członków (s. 46); Autorka rozprawy zapewne miała na myśli liczbę tych białek w proteomie człowieka. Czy oznaczenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej na podstawie zmian absorbancji przy długości fali 340 nm (nadfiolet)

jest oznaczeniem kolorymetrycznym? Nadfiolet nie ma dla nas barwy. Wartości absorbancji mierzone w spektrofotometrze są wartościami bezwzględными, niekoniecznie muszą być więc wyrażane w jednostkach względnych (Ryc. 4.1) i wtedy należałoby podać stężenie substancji, której widmo absorpcji jest pokazane. Na s. 84 najwidoczniej zamienione zostały Ryc. 4.2 i 4.3 (lub podpisy pod nimi).

Jako Tabele (np. 7-10) Autorka rozprawy traktuje zestawy zdjęć; to oryginalne podejście, wobec którego opory mogliby mieć ortodoksyjni redaktorzy czasopism zalecający submisję tabel w postaci tekstowej, nie widzę jednak nic niestosownego w takim rozszerzeniu pojęcia tabeli. Nie do końca podzielam pogląd Doktorantki traktującej wynik oznaczenia żywotności komórek z sulforodaminą B jako miarę zdolności komórek do biosyntezy białka. Miarą tempa biosyntezy białka może być np. oznaczenie ilości włączonego do białek komórkowych znakowanego radioaktywnie aminokwasu; moim zdaniem jest to po prostu miara ilości białka w żywych komórkach, która może się zmieniać w wyniku biosyntezy, ale także degradacji białka i odklejania się martwych komórek od podłoża. Wynik oznaczenia żywotności komórek z MTT zależy zarówno od liczby żywych komórek, jak i od aktywności mitochondriów w tych komórkach; użytego przez Doktorantkę sformułowanie „mitochondrial activity”, obejmuje oba czynniki i nie mam zastrzeżeń co do jego użycia. Swoją drogą, ciekawe byłoby porównanie wyników oznaczeń żywotności komórek testem z MTT i testem niezależnym od aktywności mitochondrialnej (np. opartym na oznaczeniu ilości DNA); stosunek wyników uzyskanych za pomocą obu testów mógłby zapewne być miarą średniej aktywności mitochondrialnej w komórkach, gdyby nie stosunkowo duży błąd, jakim obarczone są takie oznaczenia. Zwrot „elektrochemioterapia” (electrochemotherapy; s. 122) wydaje się przesadny w odniesieniu do doświadczeń prowadzonych na komórkach w układzie *in vitro*.

Ogólnie, rozprawa doktorska budzi moje wysokie uznanie ze względu na podjęcie frapującego tematu na styku fizyki stosowanej i biologii komórki (w pełni odpowiadającego zakresowi inżynierii biomedycznej), obszerny warsztat metodyczny, dobry dobór substancji cytotoksycznych, połączenie elektroporacji z reakcją (w przyszłości terapią) fotodynamiczną, nakład pracy, oryginalne i cenne wyniki, staranność ich opracowania, właściwe przedstawienie i dojrzałą dyskusję.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Weźgowiec spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez art. 14 i 15 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Joanny Weźgowiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Sądzę też, że ze względu na podniesione powyżej walory oraz opublikowanie wyników w trzech dobrych czasopismach międzynarodowych (sumaryczna wartość współczynnika wpływu  $IF = 6,328$ ) i dwu rozdziałów w książkach rozprawa ta zasługuje na wyróżnienie.



*Łódź, 25 maja 2016*

*Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz*