

# Autoreferat

## Imię i nazwisko

Julia Rudno- Rudzińska

## Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne- z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

Dyplom ukończenia **Akademii Medycznej we Wrocławiu**, Wydział Lekarski 2004

**Studia doktoranckie** w II Katedrze I Klinice Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu 2007-2012 zakończone obroną pracy doktorskiej pt. „**Limfangiogeneza w raku żołądka**” (promotor prof. dr hab. Wojciech Kielan)

**Dyplom doktora nauk medycznych** wydany przez Akademię Medyczną im. Piastów Śląskich we Wrocławiu 2011

**Tytuł specjalisty z zakresu chirurgii ogólnej 2013** (Uniwersytecki Szpital Kliniczny we Wrocławiu, kierownik specjalizacji prof. dr hab. Wojciech Kielan)

**Tytuł specjalisty z zakresu chirurgii onkologicznej 2016** (Dolnośląskie Centrum Onkologii we Wrocławiu, kierownik specjalizacji prof. dr hab. Marek Bębenek)

**Studia SWPS na kierunku Seksuologia Kliniczna od 2021**

## Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/medycznych

2004-2006- staż podyplomowy w **Dolnośląskim Centrum Onkologii we Wrocławiu**

2006-2008- zatrudnienie w **Pogotowiu Ratunkowym we Wrocławiu**

**Uniwersytecki Szpital Kliniczny** (zatrudnienie w II Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Onkologicznej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu):

2008-2013 jako rezydent

2013- do tej pory na stanowisku starszego asystenta

**Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu** (II Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu)

2008-2012- studia doktoranckie

2012 do tej pory zatrudnienie na stanowisku adiunkta

2019- do tej pory zatrudnienie szpital **Medicus**, Pl. Strzelecki 24, 50-224 Wrocław

**Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust.1 pkt 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)**

Przedmiotem osiągnięcia naukowego o której mowa w artykule 219 ust. 1 pkt.2 jest cykl 5 tematycznie powiązanych prac zatytułowanych „**Personalizacja leczenia raka trzustki**”. Wszystkie prace powstały po uzyskaniu tytułu doktora nauk medycznych. Jestem pierwszym ich autorem i autorem korespondencyjnym. Uzyskałam zgodę od wszystkich współautorów prac na wykorzystanie ich celem stworzenia rozprawy habilitacyjnej, a szczegółową rolę każdego z współautorów określiłam w oświadczeniach załączonych do prac.

Tytuł osiągnięcia naukowego:

### ***Personalizacja leczenia raka trzustki***

Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego:

1. **A review on Eph/ephrin, angiogenesis and lymphangiogenesis in gastric, colorectal and pancreatic cancers.**

**Julia Rudno- Rudzińska**, Wojciech Kielan, Ewelina Frejlich, Krzysztof Kotulski, Wojciech Hap, Krzysztof Kurnol, Przemysław Dzierżek, Marcin Zawadzki, Agnieszka Hałoń

Chinese Journal of Cancer Research 2017, Aug; 29(4):303-312. Doi 10.21147/j.issn.1000-9604.2017.04.03

IF 3,689

PK 20

2. **The first study of irreversible electroporation with calcium ions and chemotherapy in patients with locally advanced pancreatic adenocarcinoma.**

**Julia Rudno- Rudzińska**, Wojciech Kielan, Maciej Guziński, Maciej Płochocki, Julita Kulbacka

Applied Sciences 2020 Vol. 10 no.15 art 5163 [12 s.] DOI 10.3390/app10155163

IF 2,69

PK 100,00

3. **Effects of calcium electroporation, electrochemotherapy and irreversible electroporation on quality of life and progression free survival in patients with pancreatic cancer: IREC clinical study.**

**Julia Rudno- Rudzińska**, Wojciech Kielan, Maciej Guziński, Julita Kulbacka

Advances in Clinical and Experimental Medicine 2021 Vol.30 no.7 s.765-770  
DOI:10.17219/acem/139917

IF 1,727

PK 70,00

4. **New therapeutic strategy: personalization of pancreatic cancer treatment- irreversible electroporation (IRE), electrochemotherapy (ECT), an calcium electroporation (CaEP)- a pilot preclinical study.**

**Julia Rudno- Rudzińska**, Wojciech Kielan, Maciej Guziński, Maciej Płochocki, Agnieszka Antończyk, Julita Kulbacka



**5. Predicting the chemosensitivity of pancreatic cancer cells as a personalized therapy**

**Julia Rudno-Rudzińska** 1, Olga Mitchel 2, Maciej Płochocki 3, Julita Kulbacka 4  
Advances in Clinical and Experimental Medicine. 2022 Sep;31(9):1049-1053.  
IF 1,727  
PK 70,00

Dyplom lekarza otrzymałam w roku 2004 kończąc studia w Akademii Medycznej im Piastów Śląskich we Wrocławiu. Moje zainteresowania zawsze dotyczyły chirurgii. Początkowo jako wolontariat w Oddziale Chirurgii Dziecięcej Szpitala im T. Marciniaka od drugiego roku studiów pod kierownictwem prof. dr hab. Jana Godzińskiego, a następnie już w II Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Onkologicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu. Specjalizację z chirurgii ogólnej rozpoczęłam w 2007 roku pod kierownictwem prof. dr hab. Wojciecha Kielana łącząc pracę z zatrudnieniem w Pogotowiu Ratunkowym we Wrocławiu. Studia doktorskie rozpoczęłam w 2007 roku w wyżej wymienionej Klinice również pod kierownictwem prof. Wojciecha Kielana we współpracy z Zakładem Patomorfologii z prof. dr hab. Agnieszka Halań. Temat pracy związany był z tworzeniem naczyń chłonnych (limfangiogeneza) w raku żołądka. **Tytuł dr nauk med. uzyskałam w 2011 roku po obronie pracy „Limfangiogeneza w raku żołądka”.** Wyniki pracy były wielokrotnie przedstawiane na międzynarodowych kongresach, ostatecznie zostały opublikowane w czasopiśmie *Gastic Cancer*, *High density of peritumoral lymphatic vessels measured by D 2-40/podoplanin and LYVE-1 expression in gastric cancer patients: an excellent prognostic indicator or a false friend?*

Współpracę z Zakładem patomorfologii, z prof. dr hab. Agnieszka Halań, kontynuowałam w ramach działalności statutowej, zakończonej publikacją *HER-2 expression in immunohistochemistry has no prognostic significance in gastric cancer patients*. Halon A, Donizy P, Biecek P, Rudno-Rudzinska J, Kielan W, Matkowski R.

Scientific World Journal. 2012;2012:941259. doi: 10.1100/2012/941259. Epub 2012 May 3.

Współpraca naukowa oraz przede wszystkim na polu klinicznym jest utrzymywana do tej pory.

Kontynuując swoje zainteresowania nad progresją i rozprzestrzenianiem się nowotworów opublikowałam pracę **„A review on Eph/ephrin, angiogenesis and lymphangiogenesis in gastric, colorectal and pancreatic cancers”**. Julia Rudno-Rudzińska, Wojciech Kielan, Ewelina Frejlich, Krzysztof Kotulski, Wojciech Hap, Krzysztof Kurnol, Przemysław Dzierżek, Marcin Zawadzki, Agnieszka Hałoń, Chinese Journal of Cancer Research 2017, Aug; 29(4):303-312. Doi 10.21147/j.issn.1000-9604.2017.04.03. Praca ta stanowi przegląd piśmiennictwa na temat kompleksu Eph/ephrin, która ma znaczenie przy angiogenezie i progresji nowotworu, w tym raka trzustki, który również w temacie tych badań jest najmniej poznany. Dlatego stał się tematem moich zainteresowań.

Rak trzustki stanowi około 3% nowotworów w Polsce, zajmując 10 miejsce u mężczyzn i 12 miejsce wśród kobiet pod względem zachorowalności. Ryzyko zachorowania jest większe u mężczyzn. Jeśli chodzi o umieralność to nowotwór ten zajmuje 6 i 7 miejsce odpowiednio u mężczyzn i u kobiet. Pozycja ta jest wyższa, dlatego, że rak trzustki jest nowotworem o bardzo złym rokowaniu, a liczba nowych rozpoznań jest równa ilości zgonów. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zachorowalności na nowotwory trzustki zwłaszcza wśród populacji kobiet, przy braku poprawy rokowania pomimo upływu czasu i rozwoju nauki [1]. Według obliczeń nowotwór ten do 2030 roku stanie się drugą przyczyną zgonu w USA i Niemczech. [2] Rak trzustki rozpoznawany jest późno w związku z brakiem objawów we wczesnym stadium, chociaż wiadomo już, że nowotwór od stadium przednowotworowego PanIN do stadium raka trzustki rozwija się kilka lat, ale w przypadkach już wykrywalnych (około 2 cm) agresywnie podwaja swoją objętość co 40-60 dni. Nie jest to nowotwór występujący często, nie ma znanych i łatwo wykrywalnych stadiów przednowotworowych. Nie ma akceptowanego społecznie i ekonomicznie badania, wystarczająco swoistego, które byłoby użyteczne w badaniach przesiewowych, ponieważ nowotwór ten nie spełnia kryteriów Frame'a. Nie ma wyodrębnionej grupy



pacjentów wysokiego ryzyka zachorowania. Te wszystkie czynniki wpływają na dramatyczne przeżycie całkowite pacjentów z tym rozpoznaniem.

Po zdiagnozowaniu raka trzustki operacja radykalna możliwa jest u około 20 % pacjentów (z których tylko 20% osiągnie 5- letnia przeżycie), reszta chorych kierowana jest do leczenia paliatywnego najczęściej chemioterapii. [3]. Systemowe leczenie paliatywne tylko nieznacznie przedłuża czas przeżycia i nie zwiększa odsetka przeżyć długoletnich. Mediana przeżycia tych chorych to około 6- 10 miesięcy. Dostępne są jedynie dwa schematy systemowego leczenia pacjentów- FOLFIRINOX i GMC+nPXL. Ogółem odsetek 5- letnich przeżyć stanowi nie więcej niż 5 %, co oznacza, że wskaźnik umieralności jest porównywalny ze wskaźnikiem zachorowalności. Podsumowując, rak trzustki charakteryzuje się bardzo wysokim współczynnikiem śmiertelności do występowania. [4]

Pacjentów z rozpoznaniem rakiem trzustki dzieli się na cztery grupy: chorzy z resekcyjną zmianą, pacjenci ze zmianą granicznie resekcyjną, zmianą nieresekcyjną i uogólnionym procesem chorobowym- zmiany metastatyczne.

Największa grupa chorych to pacjenci z chorobą nieresekcyjną lub uogólnioną (80 %), u których ze względu na stadium zaawansowania pozostaje leczenie jedynie paliatywne lub objawowe, niewiele różniące się od siebie skutecznością.

Rak trzustki jest nowotworem opornym na leczenie chemioterapeutyczne. Wynika to z kilku mechanizmów. Jednym z nich jest zróżnicowanie genetyczne. W toku badań stwierdzono mutację onkogenu K-ras u około 90 % nowotworów. Mutacja genu zwiększa wydzielanie parakrynnie komórek nowotworowych co prowadzi do powstania tzw. parakrynnego środowiska, co z kolei prowadzi do powstania środowiska desmoplastycznego, ubogonaczyniowego. Przyczynia się do zaburzeń dystrybucji leku i nasila cheiooporność [5]. Ta mutacja jest kluczowa dla powstania złośliwego fenotypu. Udowodniono, że do większości mutacji dochodzi na kodonie 12 białka ras i zapoczątkowuje specyficzne dla nowotworu neo- antygeny. Są one rozpoznawalne przez limfocyty T-c i T-h. Stało się to podstawą pomysłu szczepionek w leczeniu raka trzustki z dobrym wynikiem- w badaniach klinicznych i owocuje przedłużeniem życia pacjentów [6,7]. Mutacja genu supresorowego p53 (75-90% przypadków), p16Ink4a i p15ARF powoduje upośledzenie procesu apoptozy, brak kontroli cyklu komórkowego i promuje przeżycie komórek nowotworowych [8].

Jeśli chodzi o leczenie systemowe, to dostępne są dwa schematy leczenia: nab-PXL+GMC oraz FOLFIRINOX. Choć różnice pomiędzy OS (overall survival- przeżycie całkowite) i PFS (progression free survival- przeżycie wolne od progresji) w obu schematach są nieistotne statystycznie, to zmiennie wykazuje się większą skuteczność jednego ze schematów, ze wskazaniem na mniejszą toksyczność nab-PXL+GMC [9,10,11].

Ponieważ schematy leczenia systemowego oraz nawet zaawansowana chirurgia nie przynoszą od wielu lat oczekiwanych korzyści, zaczęto rozważać inne metody leczenia mogące poprawić rokowanie. Między innymi są to ablacyjne metody poprawiające miejscową kontrolę nowotworu.

Ułożenie anatomiczne trzustki nie pozwala na stosowanie klasycznych technik ablacyjnych, termicznych, ze względu na bliskie sąsiedztwo naczyń krwionośnych oraz przewodów żółciowych. Dlatego pojawienie się nowej metody ablacyjnej, która nie wywołuje istotnego efektu termicznego wydaje się w leczeniu tego nowotworu atrakcyjna. Metodą tą jest nieodwracalna elektroporacja (IRE, ang irreversible electroporation). [12-15] IRE polega na umieszczeniu elektrod w tkance guza i podanie krótkich impulsów elektrycznych (do 100 mikrosekund) o natężeniu pola elektrycznego w zakresie 1500 do 3000 V/cm. Rearanżacja błony komórkowej otwiera dodatkowe drogi transportu zarówno dla pojedynczych jonów, jak i innych cząsteczek, np. leków. Następuje gwałtowna zmiana potencjału błony komórkowej i zaburzenie jej funkcji ochronnej. Takie zaburzenie homeostazy komórki powoduje śmierć poprzez apoptozę. [16,17] Metoda ta wydaje się bardziej atrakcyjna od termo- czy krioablacji ze względu na znikomy efekt termiczny, a przez to brak możliwości uszkodzenia struktur takich jak naczynia krwionośne i drogi żółciowe. Komórka nowotworowa zostaje zniszczona na skutek indukowania apoptozy, która jest preferowanym, najbardziej „fizjologicznym” rodzajem śmierci nieprawidłowych komórek, ponieważ pozwala zachować homeostazę tkankową i nie pozostawia toksycznych dla innych tkanek pozostałości, jak to się dzieje w przypadku nekrozy.

W związku z bezpieczeństwem stosowania, znikomym efektem termicznym, metodę IRE zaczęto stosować jako paliatywną metodę w raku trzustki [18,19]. Metoda została uznana za bezpieczną, a w leczeniu nowotworów skóry i tkanki podskórnej metoda ta została włączona do standardów postępowania NICE (National Institute of Health and Clinical Excellence, UK).



Koncentrując się na pacjentach z rakiem trzustki w II Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Onkologicznej zaplanowałam kilka badań. Równocześnie nawiązałam współpracę z prof. dr hab. Julitą Kulbacką z Katedry i Zakładu Biologii Molekularnej i Komórkowej wydziału farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Prof. dr hab. Julita Kulbacka prowadzi badania nad elektroporacją, elektrochemioterapią i elektroporacją wapniową od kilku lat. Badania dotyczyły między innymi doświadczeń na liniach komórkowych. Wykazano skuteczność elektroporacji i elektrochemioterapii. Zachęczone wynikami badań nawiązałyśmy współpracę nad zastosowaniem tych metod u pacjentów z rakiem trzustki. Współpraca jest bardzo owocna i prowadzona do tej pory.

Na przeprowadzenie projektu pod nazwą **PERSONALIZACJA LECZENIA RAKA TRZUSTKI** uzyskałam zgodę komisji bioetycznej No.: **KB-330/2018**

Pierwszym kierunkiem było wykorzystanie elektroporacji nieodwracalnej u pacjentów z nieresekcyjnym, resekcyjnym (wykonanie elektroporacji marginesu po resekcji) rakiem trzustki oraz w stadium IV (wykonanie elektroporacji również w zmianach przerzutowych w wątrobie). Początkowo metodę tą stosowałam samodzielnie.

Ponieważ proces nieodwracalnej elektroporacji powoduje destabilizację błony komórkowej dalszym etapem badań była próba podania chemioterapeutyku podczas zabiegu. Równoczesne wykonanie tej procedury i podanie chemioterapeutyku śródguzowo zwiększa cytotoksyczność danego leku względem komórek nowotworowych, jednocześnie zmniejszając dawkę potrzebną do dożylnego podania, co z kolei obniża toksyczność leku dla pacjenta. Powoduje to większą „wydajność” chemioterapii. [20]

Przeprowadzono liczne badania in vitro oraz in vivo potwierdzające skuteczność elektrochemioterapii [20-25]. Wśród leków stosowanych w elektrochemioterapii wyróżniono bleomycynę, ale również cisplatynę, które można podać dożylnie lub doguzowo. Obliczono, że cytotoksyczność w przypadku bleomycyny urosła 700-1000 razy w przypadku zastosowania jej z IRE. [26, 27]. Skuteczność elektrochemioterapii z bleomycyną wykazano na modelu zwierzęcym oraz in vivo u ludzi w przypadku raka



trzustki. W badaniach nad nieresekcyjnym rakiem trzustki pacjenci byli poddani pierwotnie chemioterapii FOLFIRINOX, nab-PXL+ GMC, a po ustabilizowaniu zmiany (braku progresji) poddani elektrochemioterapii. Metodę tę uznano za bezpieczną, nie było ani jednego przypadku zgonu. Zaobserwowano wodobrzusze jako powikłanie i kolekcje płynowe w lewej jamie opłucnej. W przeważającej ilości podawano tuż przed zabiegiem lub śródoperacyjnie bleomycynę w dawce 15.000 IU/m<sup>2</sup>. [28].

Badania przeprowadzono również na bardzo wielu chemioterapeutykach, np z cisplatyną czy doksorubicyną [29-32]. Biorąc pod uwagę chemooporność komórek raka trzustki i słabą penetrację chemioterapeutyków do komórek nowotworowych zwiększenie ich toksyczności w środowisku guza wydaje się być obiecującym zjawiskiem.

Towarzyszącym elektrochemioterapii zjawiskiem jest „efekt naczyniowy”. Polega na dwóch procesach. Pierwszy z nich polega na obumieraniu śródbłonna naczyń krwionośnych guza, co potęguje śmierć komórek nowotworowych. Drugi efekt polega na zwężeniu naczyń, co może powodować zaburzenia dopływu krwi i odpływu. Dlatego ważne jest dożylne podanie chemioterapeutyku przed procedurą elektroporacji. Następuje wtedy penetracja tkanki guza przez lek, a po wykonaniu procedury elektroporacji pojawiają się zaburzenia odpływu, co skutkuje lokalnym wzrostem stężenia chemioterapeutyku i zwielokrotnieniem jego toksyczności względem komórek nowotworowych. [33,34] Rak trzustki jest nowotworem o środowisku desmoplastycznym, ubogonaczyniowym. Zwiększenie stężenia chemioterapeutyku i jego „uwięzienie” w środowisku guza przyczynia się do poprawy efektów toksycznych. Ponadto IRE w połączeniu z chemioterapią indukuje odpowiedź immunologiczną. Zjawisko to zostało sprawdzone *iv vitro* i *in vivo* w przypadku raka jelita grubego. Pobudzane są limfocyty Tc, a śmierć komórki następuje na drodze apoptozy. Prawdopodobnie komórki Tc odpowiedzialne za śmierć komórek nowotworowych są odpowiedzialne również za pamięć immunologiczną. Istnieją doniesienia o regresji choroby nie tylko lokalnie, ale również ogólnie. Wiadomo również, że zabieg elektroporacji powoduje pobudzenie układu odpornościowego do tego stopnia, że wywołuje abscopal effect, czyli remisje zmian odległych nie poddanych ECT lub IRE. [35]

Z punktu widzenia logiki zabieg elektroporacji czy elektrochemioterapii powinien być skuteczny we wszystkich guzach litych, niezależnie od rozpoznania histopatologicznego, ponieważ mechanizmy biorące w nich udział nie są zależne od rodzaju komórki nowotworowej. Ponadto odpowiedź powinna być uogólniona, a nie jedynie miejscowa. Niestety tak się nie dzieje ze względu na to, że nowotwory mają różną chemiowrażliwość oraz immunogenność. Różne jest również unaczynienie guza (im zmiana bardziej unaczyniona tym skuteczniejszy powinien być zabieg). Znaczenie ma również immunokompetentność pacjenta, a najważniejszym czynnikiem jest skuteczna, dokładna i zaplanowana elektroporacja z prawidłową lokalizacją igieł.

Kolejną „gałęzią” elektroporacji jest elektroporacja wapniowa (CaEP). Wapń jest internalizowany do komórki nowotworowej w nadmiernej ilości, ponieważ na skutek elektroporacji zostają zaburzone mechanizmy regulacyjne. Wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia powoduje śmierć i martwicę komórek poprzez zaburzenia szlaku powstawania ATP. Sam proces IRE powoduje deficyt ATP. Bez podania wapnia poziom ten wyrównuje się po około 4 godzinach. Jeśli elektroterapia zostanie uzupełniona przez podanie wapnia, to poziom ATP spada jeszcze niżej i nie jest uzupełniany. Ponadto wysokie śródkomórkowe stężenie wapnia powoduje permabilizację błony mitochondrialnej i uniemożliwia produkcję ATP. Obserwuje się również aktywację lipazy i proteazy, powstaniem wolnych rodników tlenowych, co również może powodować śmierć komórki. Przesunięcia elektrolitowe powodują również zaburzenia pracy pompy sodowo- potasowej oraz bezpośrednią utratę ATP podczas elektroporacji. Generuje również powstanie uogólnionej reakcji zapalnej oraz powstanie pamięci immunologicznej. W chwili obecnej takie postępowanie jest w standardach leczenia zmian przerzutowych czerniaka, ale wydaje się być bezpieczną, taną i efektywną metodą w innych nowotworach. [36,37,38,39,40,41,42]

Opierając się na wyżej wymienionych mechanizmach oporności raka trzustki można założyć hipotezę, że zastosowanie elektrochemioterapii zwiększy penetrację leku nie tylko poprzez zwiększenie stężenia samego leku, ale również poprzez uszkodzenie desmoplastycznego środowiska, a efekt „uwięzienia” bleomycyny podczas ECT zwiększy dostępność leku. Pobudzenie układu immunologicznego zniweluje efekty zmienności genetycznej.



Opierając się na wyżej wymienionych wynikach badań w II Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Onkologicznej wykonuje się zabiegi elektroporacji, elektroporacji wapniowej i elektrochemioterapii od roku 2018. Początkowo wykonywano zabieg IRE. Następnie zabiegi rozszerzyłam o śródguzowe podanie jonów wapnia lub dożylnie podanie cisplatyny, zgodnie z powyżej podanym piśmiennictwem. Projekt rozszerzono w oparciu o badania i współpracę z prof. dr hab. Julitą Kulbacką. Jest to dobry przykład ewolucji badań przeprowadzonych in-vitro lub na liniach komórkowych do bezpiecznego wykorzystania wiedzy w praktyce- leczeniu pacjentów,

W projekcie uczestniczy dr hab. Maciej Guziński z Katedry i Zakładu Radiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, specjalista z zakresu radiologii oraz Maciej Płochocki z Oddziału Onkologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu.

Projekt „**Personalizacja leczenia raka trzustki**” z wykorzystaniem IRE, IRE-CaEP i ECT zakładał kwalifikacje pacjentów z niesrekecyjną zmianą oraz ze zmianami metastatycznymi. Nie był wyróżniony „moment terapeutyczny” wykorzystania samej metody. Pacjent mógł być przed leczeniem systemowym, w trakcie chemioterapii, w przypadku braku możliwości lub zgody pacjenta na leczenie systemowe. Kwalifikacje do tego typu leczenia otrzymywali również pacjenci ze wznową procesu nowotworowego, po resekcji raka trzustki. Metodę również używano po resekcji celem potencjalizacji marginesu operacji. Nie dyskwalifikowano pacjentów, którzy już przeszli IRE- wykonywano ją ponownie. U pacjentów w stadium IV wykonywano zabieg elektroporacji zmiany pierwotnej i zmian przerzutowych. Kryteriami wykluczenia były wszczepiony kardiowerter oraz ciężkie zaburzenia rytmu serca. Dane kliniczno-patologiczne obejmowały stan sprawności pacjenta wg skali WHO/ ECOG, analiza chorób towarzyszących wg Charlson Comorbidity Index, analiza leczenia przeciwbólowego oraz poziom bólu według skali VAS, wymiar guza oraz ocena jego zmian po zabiegu badane w TK jamy brzusznej, poziom markera Ca 19-9, BMI, aktualna waga, ubytek masy ciała, poziom amylazy, poziom Hb oraz powikłania pozabiegowe w skali Clavien- Dindo.

Stosowano elektroporacje jako jedyną metodę, elektroporacje z jonami wapnia oraz elektrochemioterapię z dożylnym podaniem cisplatyny. Chemioterapeutyk ten



wybrano z uwagi na wcześniejsze doświadczenia prof. dr hab. Julity Kulbackiej na liniach komórkowych oraz w związku z obecnością pochodnych platyny w schematach leczenia raka trzustki.

Podstawowym pytaniem/ zadaniem było umiejscowienie procedury optymalnie dla planu leczenia pacjenta oraz określenie optymalnych kryteriów kwalifikacji.

Pierwsze wyniki badań opublikowałam w pracy **“The first study of irreversible electroporation with calcium ions and chemotherapy in patients with locally advanced pancreatic adenocarcinoma.”** (Julia Rudno- Rudzińska, Wojciech Kielan, Maciej Guzinski, Maciej Płochocki, Julita Kulbacka *Applied Sciences* 2020 Vol. 10 no.15 art 5163 [12 s.] DOI 10.3390/app10155163, IF 2,69, PK 100,00).

Według dostępnego piśmiennictwa **metodę elektroporacji z jonami wapnia u pacjentów z rakiem trzustki zastosowano po raz pierwszy**, dlatego zdecydowałam się na oddzielną publikację tych przypadków. U obu pacjentów zastosowałam elektroporację wapniową oraz dożylne podanie cisplatyny w należytą dawkę, pod kontrolą prowadzącego onkologa klinicznego. Analizowałam bezpieczeństwo zastosowania metody, możliwe powikłania oraz skuteczność.

Pierwszy z pacjentów, 58- latek bez istotnych obciążeń, operowany pierwotnie z powodu niedrożności dwunastnicy. Wykonano zespolenia omijające oraz potwierdzono raka trzustki. Pacjenta skierowano do leczenia systemowego. Po 5 cyklach nab-PXL+GMC chory odmówił dalszego leczenia z uwagi na złą tolerancję. Wykonano IRE-CaEP, podając wapń przed procedurą śródguzowo. Po zabiegu u pacjenta doszło do martwiczego zapalenia trzustki, leczonego zachowawczo. Oceniono na III/IV w skali Clavien- Dindo. Następnie pacjenta skierowano ponownie do leczenia systemowego, niestety opóźnionego z uwagi na OZT. Drugi pacjent, 60- letni mężczyzna, również po leczeniu systemowym (12 cykli FOLFOX) i operacji paliatywnej. U pacjenta wykonano zarówno IRE- CaEP oraz użyciem cisplatyny. W tym wypadku jony wapnia podano po IRE. Dodatkowo przed procedurą u pacjenta usunięto metalową protezę i zastąpiono ją zespoleniem przewodowo- jelitowym. U pacjenta nie zaobserwowano zapalenia trzustki, ale nastąpił wyciek treści trzustkowej do drenu- przetoka, która ustąpiła po leczeniu zachowawczym i nie spowodowała opóźnienia dalszego leczenia systemowego.

Przeżycie pierwszego pacjenta łącznie 9 miesięcy. Pacjent zmarł 6 miesięcy po przeprowadzonej procedurze. W przypadku drugiego pacjenta przeżycie całkowite to 30 miesięcy i 19 miesięcy od procedury IRE z poprawą jakości życia i czasowymi przerwami w leczeniu systemowym.

W pracy analizowałam bezpieczeństwo procedury, skuteczność oraz różnice w przebiegu pooperacyjnym. Podstawowym wnioskiem i różnicą pomiędzy oboma przypadkami był czas podania jonów wapnia. W przypadku podania ich przed procedurą może dojść do zmiany przewodnictwa w obrębie guza. Podanie śródguzowe jonów wapnia po procedurze IRE wydaje się być bezpieczne. Przeżycie, poprawa jakości życia, możliwość okresowego odstawienia leczenia systemowego u drugiego pacjenta wydaje się być obiecujące. Oczywiście konkluzją była zbyt mała ilość przypadków i wymóg przeprowadzenia dalszych badań, które kontynuowałam w II Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Onkologicznej.

Dalsze rezultaty opublikowałam w pracy **“New therapeutic strategy: personalization of pancreatic cancer treatment- irreversible electroporation (IRE), electrochemotherapy (ECT), an calcium electroporation (CaEP)- a pilot preclinical study”** (Julia Rudno- Rudzińska, Wojciech Kielan, Maciej Guziński, Maciej Płochocki, Agnieszka Antończyk, Julita Kulbacka *Surgical Oncology* 2021 Vol.38 art.101634 [8s] DOI 10.1016/j.suronc.2021.101634 IF 3,279 PK 100). W pracy zawarto dane o 13 kolejnych pacjentach kwalifikowanych do zabiegu w różnym stadium zaawansowania (również stadium IV) oraz różnym „momencie terapeutycznym”. Praca dotyczyła 13 pacjentów, z wyłączeniem dwóch poprzednich, leczonych z powodu zmian nieresekcyjnych, choroby oligometastatycznej lub wznowy. Część z nich kwalifikowana była bez adiuwantowej chemioterapii, jako pierwszy etap leczenia, część w trakcie leczenia systemowego. Po zabiegu wszystkim pacjentom zalecano dalsze leczenie chemioterapeutyczne. W pracy analizowano bezpieczeństwo, całkowity czas przeżycia. Próbowano porównać metody pomiędzy sobą, wyselekcjonować pacjentów odpowiednich dla tej metody. Podjęto próbę określenia odpowiedniej „sekwencji” leczenia włączając metody IRE, ECT (cisplatyna podana dożylnie), CaEP.



Wszystkie metody uznano za bezpiecznie, jednak wymagają dalszych badań. **Uzyskano całkowity czas przeżycia wynosił 26 miesięcy, niektórzy z pacjentów nadal pozostają w obserwacji.** U niektórych pacjentów zabieg IRE był drugą lub nawet trzecią procedurą w ciągu trwania choroby. Wyniki badanych metod, w połączeniu z leczeniem systemowym, są bardzo zachęcające w porównaniu z jedynym leczeniem systemowym.

**Wyniki przedstawiłam podczas nagrodzonej prezentacji na 4-th International Scientific Meetings Wrocław, Poland.**

W związku z powyższym, celem przeprowadzenia dalszych, szerokich badań złożyłam wniosek o finansowanie do Agencji Badań Medycznych pod kierownictwem prof. dr hab. Wojciecha Kiełna oraz z moim udziałem jako współkierownikiem, pomysłodawcą projektu i odpowiedzialną za realizację projektu.

Uzyskałam środki (Projekt nr 2020/ABM/01/00098/P/02 finansowany ze środków ABM), a założenia projektu opisałam w pracy „Effects of calcium electroporation, electrochemotherapy and irreversible electroporation on quality of life and progression free survival in patients with pancreatic cancer: IREC clinical study.” Julia Rudno- Rudzińska, Wojciech Kielan, Maciej Guziński, Julita Kulbacka *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 2021 Vol.30 no.7 s.765-770 DOI:10.17219/acem/139917 IF 1,727 PK 70,00. Wygłosiłam wykład, który był zaproszeniem do udziału w projekcie i który został nagrodzony podczas 70- tego Zjazdu Towarzystwa Chirurgów Polskich w Toruniu „IREC- Badanie kliniczne wpływ nieodwracalnej elektroporacji wapniowej, elektrochemioterapii oraz elektroporacji (CaEP, ECT oraz IRE) na jakość życia oraz przeżycie wolne od progresji u chorych na raka trzustki- zaproszenie do współpracy”.

**Partnerem zagranicznym i mentorem jest prof. Julie Gehl z Zealand University Hospital, Department of Clinical Oncology and Palliative Care, Dania**

Do projektu IREC kwalifikowani są dorośli pacjenci z rozpoznaniem nieresekcyjnym, potwierdzonym histopatologicznie, rakiem trzustki w III stadium zaawansowania choroby lub ze wznową procesu nowotworowego po resekcji. Po przeanalizowaniu wcześniejszych wyników wykluczono osoby w IV stadium zaawansowania, z uwagi na brak korzyści oraz możliwość pogorszenia stanu zdrowia



uniemożliwiającego kontynuowanie leczenia systemowego. Przeciwwskazaniem do zastosowania wyżej wymienionej metody są osoby z ciężkimi zaburzeniami rytmu serca, z wszczepionym rozrusznikiem/ defibrylatorem, uczuleniem na bleomycynę oraz pacjenci z udokumentowanym zwłóknieniem płuc. Zabieg przeprowadzany jest z dostępu otwartego lub przezskórnego pod kontrolą tomografii komputerowej (TK), lub USG. Pacjenci mogą być w trakcie chemioterapii lub przed nią, przy czym preferuje się pierwotne leczenie systemowe. Zmianę ocenia się w tomografii komputerowej jamy brzusznej lub rezonansie magnetycznym, ale badanie nie może być starsze niż 30 dni, a wielkość zmiany nie może przekraczać 6 cm. Zabieg przeprowadzany jest w znieczuleniu ogólnym, po zwiótczeniu i intubacji pacjenta, zgodnie ze standardami ESCOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy). Po zabiegu u pacjentów kontrolowane są morfologia, lipaza, amylaza, Ca 19-9. Kontrola obrazowa obejmuje wykonanie TK jamy brzusznej i miednicy lub/i MR jamy brzusznej w odstępach miesiąc, trzy, sześć miesięcy oraz rok po wykonaniu procedury. W tych odstępach wykonywane są również badania laboratoryjne. Oceniane są powikłania (przetoka trzustkowa, przetoka dwunastnicza, wodobrzusze, nasilenie bólu, krwawienie do jamy otrzewnowej, zakrzepica, opóźnione opróżnianie żołądka) wg skali Clavien-Dindo. Oceniana jest jakości życia poprzez 3 skale: QQL-PAN26, WHO QQL oraz VAS. Punktem końcowym jest również przeżycie wolne od progresji (Progression Free Survival, PFS).

Pacjenci są randomizowani do jednej z trzech grup. Grupa A- pacjenci poddani wyłącznie elektroporacji (IRE), grupa B- pacjenci poddawani elektrochemioterapii z bleomycyną podawaną dożylnie i doguzowo (ECT) oraz grupa C- pacjenci poddani elektroporacji wapniowej (CaEP).

Kolejna część badania dotyczy aktywacji układu immunologicznego. U pacjentów pobierane są próbki krwi, oznaczane są interleukiny na początku, w dniu zabiegu oraz przy każdej kolejnej kontroli.

**Projekt IREC został zaplanowany na 6 lat. Rekrutacja pacjentów rozpoczęła się w marcu 2022, do czasu pisania autoreferatu (wrzesień) wykonano 25 zabiegów. Ponieważ projekt finansuje leczenie dla 70 pacjentów, a rekrutacja jest bardzo szybka, planowane jest rozszerzenie projektu (zwiększenie liczby pacjentów).**

Kolejną częścią projektu „Personalizacja leczenia raka trzustki” jest oznaczenie chemiowrażliwości raka trzustki indywidualnie dla każdego pacjenta celem doboru leczenia systemowego. Założeniem projektu było śródoperacyjne pobranie wycinków od pacjentów, wyprowadzenie linii komórkowych i określenie chemiowrażliwości na GMC i 5-FU. Pozwoli to dobrać leczenie onkologiczne i różnicuje chemioterapię pomiędzy GMC+nPxL a schematami opartymi na 5-FU. Badanie prowadzone było w ramach działalności naukowo- badawczej ST- SUB.A190-19.026 również przy współpracy z prof. dr hab. Julitą Kulbacką, a jego wyniki opublikowałam w pracy “Predicting the chemosensitivity of pancreatic cancer cells as a personalized therapy” Julia Rudno-Rudzińska <sup>1</sup>, Olga Mitchel <sup>2</sup>, Maciej Płochocki <sup>3</sup>, Julita Kulbacka <sup>4</sup>. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2022 Sep;31(9):1049-1053. Projekt napotkał początkowo trudności związane z procesem hodowli linii komórkowych raka trzustki. Założeniem było pobranie śródoperacyjnych wycinków od danego pacjenta, wyprowadzenie linii komórkowych, a następnie określenie chemiowrażliwości. Wyniki badań miały realny wpływ na leczenie pacjentów. W przypadku jednego z pacjentów zmiana była resekcyjna po zastosowaniu chemioterapii neoadiuwantowej: GMC+nabPxL. Po zabiegu resekcyjnym, a przed otrzymaniem wyników chemiowrażliwości, u pacjenta zastosowano schemat FOLFIRINOX. Doszło do progresji, a w wyniku chemiowrażliwości nowotwor okazał się być bardziej wrażliwy na chemioterapeutyki z pierwszej linii leczenia. Zmieniono ponownie terapię na GMC+nabPXL. W pracy udowodniono również chemiooporność zmian przerzutowych. Temat ten stanowi ciekawy kierunek badań i będzie kontynuowany.

**Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.**

Podstawą do mojego rozwoju naukowego stały się liczne staże, szkolenia zagraniczne i krajowe.



Na szczególną uwagę zasługuje staż w **Seoul National University Hospital (SNUH) w Korei pod kierownictwem prof. Hang- Kwang- Yang z zakresu leczenia raka żołądka (2011rok).**

Współpraca z prof. Alexander Ferko z **Fakultny Nemocnice Hradec Kralove** zaowocowała **najpierw kursem laparoskopowym (2010)** a następnie **miesięcznym stażem z zakresu laparoskopowej chirurgii kolorektalnej w Fakultny Namocnice Hradec Kralove (2013).**

Korzystając ze stypendium Towarzystwa Chirurgów Polskich brałam udział w szkoleniach: **27th International Workshop for Gastrointestinal Surgery with conventional and laparoscopic techniques (2010, Davos, Switzerland)** oraz **Laparoscopic surgery of colon cancer (2012 Wendisch Reitz, Germany).**

Staż z zakresu chirurgii wątroby w **Klinice Chirurgii Ogólnej, Transplantacyjnej i Wątroby (2017)** pod kierownictwem **prof. dr hab. Krzysztofa Zieniewicza.**

Następnym etapem rozwoju umiejętności chirurgicznych było skierowanie się w stronę **chirurgii robotowej. Uczestniczyłam w szkoleniu w Szpitalu Derriford Hospitalw Plymouth (2021) jako obserwator.**

W II Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej aktywnie uczestniczyłam w rozwoju chirurgii laparoskopowej nowotworów przewodu pokarmowego. **W związku z tym w roku 2018, oddział otrzymał akredytację z zakresu szkolenia w chirurgii onkologicznej.** W chwili obecnej w klinice pracuje 3 lekarzy specjalistów z zakresu chirurgii onkologicznej, a szkolących się jest kolejnych trzech lekarzy.

Od 2015 roku byłam **zaangażowana w organizację pracy Poradni Chirurgii Onkologicznej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego.** Obecnie poradnia to obsługuje pacjentów zatrudniając czterech lekarzy specjalistów z zakresu chirurgii onkologicznej, w pakiecie DiLO oraz poza nim diagnozując i nadzorując pacjentów po leczeniu chirurgicznym, onkologicznym.

Prowadzę również współpracę z **Kliniką Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.** Owocem tej współpracy są dwie publikacje.

Ponadto uczestniczę w międzynarodowych projektach. **GASTRODATA-europejski projekt dotyczący powikłań po gastrektomii pod kierownictwem prof.**



**Gian Luca Biocchi. Badanie odbywa się w ramach International Gastric Cancer Association.**

**Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.**

Od momentu rozpoczęcia studiów doktoranckich prowadzę zajęcia dla studentów piątego roku z zakresu chirurgii ogólnej i onkologicznej w Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu. Równocześnie prowadzę wykłady z chirurgii ogólnej i onkologicznej na temat przygotowania pacjentów do zabiegów chirurgicznych, diagnostyki chorób nowotworowych przewodu pokarmowego oraz nowotworów jelita grubego. W 2022 roku grupa została również **opiekunem koła chirurgicznego**, w którym prowadzę zajęcia w Centrum Symulacji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Studenci również uczestniczą w ostrych dyżurach chirurgicznych oraz piszą prace naukowe w ramach koła.

Pasje leczenia chorób nowotworowych przełożyłam również na **szkolenie dla lekarzy rodzinnych zorganizowanych przeze mnie we współpracy z Dolnośląską Akademią umiejętności Lekarzy Rodzinnych**. Celem było przekazanie standardów diagnostyki i leczenia chorób nowotworowych („Diagnostyka nowotworów przewodu pokarmowego” 2018) oraz opieki nad pacjentami pooperacyjnymi w ramach POŻ („Postępowanie pooperacyjne z pacjentami po zabiegach chirurgicznych. Systemy stomijne, opatrunki, leczenie trudno gojących się ran” 2019).

Prowadzę również **wykłady z chirurgii laparoskopowej dla lekarzy weterynarii** szkolących się w specjalizacji chirurgicznej.

Od 2019 roku pracuje w zespole **„Endoteam”** prywatnego szpitala Medicus, Wrocław. Pod kierownictwem dr nauk med. Mikołaja Karmowskiego, we współpracy z **Fundacją Pokonać Endometriozę** brałam udział i organizowałam szkolenia i konferencję rozpowszechniającą wiedzę na temat endometriozy. Zostałam za to nagrodzona **wyróżnieniem przez Fundację Pokonać Endometriozę**. Dodatkowo Centrum Leczenia Endometriozy w szpitalu Medicus, po odbyciu wizytacji, dostał

certyfiat, jedy w Polsce, **Masterclass Excelence** od Europejskiego Towarzystwa Ginekologii za jakość wykonywanych operacji z moim udziałem.

**Informacje, waone z jego punktu widzenia, dotyczce jego kariery zawodowej**

Od 2021 roku jestem równie **studentką na uniwersytecie SWPS**. Kierunkiem przeze mnie wybranym jest seksuologia.

Od 2018 roku jestem **członkiem Rady Nadzorczej firmy Unity S.A.**



1. Siegel RL, Cancer statistics, CA: a cancer journal for clinicians, Jan; 68(1): 7-30. doi 10.3322/caac.21442. Epub 2018 Jan 4
2. Rahib L et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver and pancreas in the United States. Cancer Research. 2014 Jun 1;74(11):2913-21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0155
3. Quante AS et al. Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030. Cancer Medicine 2016 Sep;5(9):2649-56. doi 10.1002/cam4.767
4. Klabier U et al. Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy in pancreatic cancer. Langenbecks archives of surgery. 2018 Dec;403(8):917-932. doi 10.1007/s00423-018-1724-8
5. Jiang Liu et al. Critical role of oncogenic KRAS in pancreatic cancer (Review), Molecular Medical Reports, 13 (6), 4943-9, doi: 10.3892/mmr.2016.5196
6. Cheng H, et al. Kras(G12D) mutation contributes to regulatory T cell conversion through activation of the MEK/ERK pathway in pancreatic cancer. Cancer Letters 2019. 446, 103-111 2019 Apr 1, doi: 10.1016/j.canlet.2019.01.013
7. Thomas A.Mace et al. IL-6 and PD-L1 Antibody Blockade Combination Therapy Reduces Tumour Progression in Murine Models of Pancreatic Cancer. Gut 67(2) 320-332, Feb 18, doi: 10.1136/gutjnl-2016-311585
8. Jonas Cicens et al. KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1 and BRCA2 mutations in pancreatic cancer. Cancers 2017 May 9 (5);42. Doi: 10.3390/cancers9050042
9. S. Pusceddu; M. Ghidini; M. Torchio et al. Comparative Effectiveness of Gemcitabine plus Nab-Paclitaxel and FOLFIRINOX in the first linesetting of metastatic pancreatic cancer. A systemic review and meta-analysis. Cancers 2019, 11,484 doi: 10.3390/cancers11040484.
10. [7] J.Chen; Q. Hua; H. Wang et al. Meta-analysis and indirect treatment comparison of modified FOLFIRINOX and gemcitabine plus nab-paclitaxel at first-line chemotherapy in advanced pancreatic cancer. BMC Cancer 21: 853; doi: 10.1186/s12885-021-08605-x.
11. [8] T. Muranaka; M. Kuwatani; Y. Komatsu et al. Comparison of efficiency and toxicity of FOLFIRINOX and gemcitabine with nab-paclitaxel in unresectable pancreatic cancer. Journal of Gastrointestinal Oncology 2017 Jun;8(3):566-571. doi: 10.21037/jgo.2017.02.02.
12. Daniels C et al. Electrical field and temperature model of nonthermal irreversible electroporation in heterogenous tissues. Journal of Biomechanical Engineering 2009; 131:071006
13. Lee Ew et al. Advanced hepatic ablation technique for creating complete cell death: irreversible electroporation. Radiology 2010;255:426-433

14. Lee EW et al. Irreversible electroporation: A novel image- guided cancer therapy. *Gut and Liver* 2010; Vol4 S99-104
15. Maor E. Endovascular nonthermal irreversible electroporation: a finite element analysis. *Journal of Biochemical and Engineering* 2010;132:031008
16. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment disease. *Science* 1995;267:1456-1462
17. Susin SA. Et al., Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. *Nature* 1999;397:441-446
18. Lambert L. Et al. Treatment of locally advanced pancreatic cancer by percutaneous and intraoperative irreversible electroporation: general hospital cancer center experience. *Neoplasma* 2016; 63,2
19. Martin R. Et al., Irreversible electroporation in locally advanced pancreatic cancer: potential improved overall survival. 2010 *Annals of Surgical Oncology*
20. Miklavcic D. et al. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *Biomedical engineering online*. 2014 Mar 12;13(1):29 doi:10.1186/1475-925X-13-29
21. Escoffire JM. et al. Electrochemotherapy: progress and prospects. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(23):3406-15
22. Mir LM, Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses. *European journal of cancer*. 1991;27(1):68-72 doi:10.1016/0277-5379(91)90064-k
23. Girelli R. et al., Feasibility and safety of electrochemotherapy (ECT) in the pancreas: a pre-clinical investigation. *Radiology and oncology*. 2015 Mar 25;49(2):147-54 doi:10.1515/raon-2015-0013
24. Falk H. et al, Electrochemotherapy and calcium electroporation inducing a systemic immune response with local and distant remission of tumors in a patient with malignant melanoma – a case report. *Acta oncologica* Volume 56, 2017 doi:10.1080/216102X.2017.1301332
25. Zhang Z et al., Rapid dramatic alterations to the tumor microstructure in pancreatic cancer following irreversible electroporation ablation. *Nanomedicine*. 2014;9(8):1181-92 doi:10.2217/nnm.13.72
26. Sersa G et al., Contrast enhanced MRI assessment of Tumor Blood Volume After Application of Electric Pulses. *Electromagnetic biology and medicine* 2017(2):299-306
27. Sersa G. et al. Tumor blood flow modifying effect of electrochemotherapy with bleomycin. *Anticancer Research*. 1999 Sep-Oct;19(5B):4017-22
28. Granata V, Fusco R, Piccirillo M, Palaia R, Petrillo A, Lastoria S. et al. Electrochemotherapy in locally advanced pancreatic cancer: Preliminary results. *Int J Surg*. 2015;18:230–6. [PubMed]



29. Mir LM, Banoun H, Paoletti C. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporation: direct access to the cytosol. *Exp Cell Res.* 1988;175(1):15–25. doi: 10.1016/0014-4827(88)90251-0.
30. Sersa G, Stabuc B, Cemazar M, Jancar B, Miklavcic D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: potentiation of local cisplatin antitumour effectiveness by application of electric pulses in cancer patients. *Eur J Cancer.* 1998;34(8):1213–1218. doi: 10.1016/S0959-8049(98)00025-2. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
31. Mir LM, Gehl J, Sersa G, Collins CG, Garbay JR, Billard V, Geertsen PF, Rudolf Z, O'Sullivan GC, Marty M. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *Eur J Cancer Suppl.* 2006;4(11):14–25. doi: 10.1016/j.ejcsup.2006.08.003.
32. Sersa G, Cemazar M, Miklavcic D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum(II) in mice. *Cancer Res.* 1995;55(15):3450–3455.
33. Jarm T, Cemazar M, Miklavcic D, Sersa G. Antivascular effects of electrochemotherapy: implications in treatment of bleeding metastases. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2010;10(5):729–746. doi: 10.1586/era.10.43.
34. Sersa G, Jarm T, Kotnik T, Coer A, Podkrajsek M, Sentjurc M, Miklavcic D, Kadivec M, Kranjc S, Secerov A, Cemazar M. Vascular disrupting factor of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin and murine sarcoma. *Br J Cancer.* 2008 Jan 29;98(2):388–98. doi: 10.1038/sj.bjc.6604168. Epub 2008 Jan 8. PMID: 18182988
35. Michael A et al., Immunologic Correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *New Eng Med* 2012; 366:925–931 doi:10.1056/NEJMoa1112824
36. E.M. Wasson, J.W. Ivey, S.S. Verbridge, R.V. Davalos
37. The feasibility of enhancing susceptibility of glioblastoma cells to IRE using a calcium adjuvant
38. *Ann. Biomed. Eng.*, 45 (2017), pp. 2535–2547, 10.1007/s10439-017-1905-
39. E.M. Wasson, N. Alinezhadbalalami, R.M. Brock, I.C. Allen, S.S. Verbridge, R.V. Davalos  
Understanding the role of calcium-mediated cell death in high-frequency irreversible electroporation.  
*Bioelectrochemistry*, 131 (2020), p. 107369, 10.1016/j.bioelechem.2019.107369
40. E.L. Hansen, E.B. Sozer, S. Romeo, S.K. Frandsen, P.T. Vernier, J. Gehl Dose-Dependent ATP depletion and cancer cell death following calcium electroporation, relative effect of calcium concentration, and electric field strength *Plos One*, 10 (2015), 10.1371/journal.pone.0122973

41. S.K. Frandsen, J. Gehl Effect of calcium electroporation in combination with metformin in vivo and correlation between viability and intracellular ATP level after calcium electroporation in vitro PloS One, 12 (2017), Article e0181839, 10.1371/journal.pone.0181839E. Carafoli, L. Santella, D. Branca, M. Brini
42. E. Carafoli, L. Santella, D. Branca, M. Brini Generation, control, and processing of cellular calcium signals Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 36 (2001), pp. 107-260, 10.1080/20014091074183
43. K.L. Hoejholt, T. Mužić, S.D. Jensen, L.T. Dalgaard, M. Bilgin, J. Nylandsted, T. Heimborg, S.K. Frandsen, J. Gehl Calcium electroporation and electrochemotherapy for cancer treatment: importance of cell membrane composition investigated by lipidomics, calorimetry and in vitro efficacy Sci. Rep., 9 (2019), 10.1038/s41598-019-41188-z
44. H. Falk, S. Lambaa, H.H. Johannesen, G. Wooler, A. Venzo, J. Gehl Electrochemotherapy and calcium electroporation inducing a systemic immune response with local and distant remission of tumors in a patient with malignant melanoma—a case report Acta Oncol. (Madr.), 56 (2017), pp. 1126-1131, 10.1080/0284186X.2017.1290274

