



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Dr hab. Agnieszka Wolnicka-Głubisz, prof. UJ
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Zakład Biofizyki i Biologii Nowotworów

Kraków, 16.12.2024

Recenzja
rozprawy doktorskiej Pani mgr Zofii Łapińskiej
z tytułowanej
“Wykorzystanie elektroporacji z jonami wapnia oraz estradiolem w
leczeniu raka jajnika na modelu *in vitro* “
wykonanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab inż. Julity Kulbackiej
oraz promotora pomocniczego Pani dr Dagmary Baczyńskiej

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Dr hab. Agnieszka
Wolnicka-Głubisz, prof. UJ

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Zofii Łapińskiej jest zbiorem tematycznie spójnych trzech artykułów opublikowanych w latach 2020-2023, w tym dwóch prac doświadczalnych opublikowanych w *Pharmaceuticals* i w *Bioelectrochemistry* oraz jednej pracy przeglądowej opublikowanej w *Molecules*, oraz danych nieopublikowanych, co wypełnia art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity Dz.U. z 2021r. poz. 478. Z zgodnie z powyższym „rozprawa doktorska może mieć formę (...) spójnego tematycznie zbioru publikacji opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych, określonych przez ministra właściwego do spraw nauki na podstawie przepisów dotyczących finansowania nauki (...) i, co ważne, Pani mgr Zofia Łapińska jest pierwszym autorem wszystkich prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

Przygotowana rozprawa składa się z trzynastu rozdziałów obejmujących: Streszczenie w języku polskim i angielskim (2 strony), Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej (1 strona), Wstęp (5 stron), Cel i graficzna prezentacja koncepcji pracy (2 strony), Materiały i metody (7 stron), Podsumowanie oraz wnioski (14 stron), Piśmiennictwo (7 stron; 63 pozycje), Spis załączonych figur (3 strony), Artykuły z cyklu publikacji w formie załączników (62 strony, 3 artykuły), Oświadczenia współautorów (15 oświadczeń), Życiorys oraz dorobek naukowy (8 stron).

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48(12) 664 6526
fax +48(12) 664 69 02
email: a.wolnicka-
glubisz@uj.edu.pl

Ocena merytoryczna pracy

Rak jajnika charakteryzuje się wysoką śmiertelnością, na co wpływ ma późne rozpoznanie choroby związane z bezobjawowym przebiegiem jej początkowych stadiów i z brakiem skutecznych narzędzi do wczesnej

diagnostyki i do badań przesiewowych. Standardowe leczenie zaawansowanego epitelialnego raka jajnika obejmuje zabieg chirurgiczny i chemioterapię na bazie paklitakselu i pochodnych platyny. Pomimo dobrej wczesnej odpowiedzi na leczenie, nawroty choroby i narastająca chemiooporność sprawiają, że nowotwór ten należy do chorób o wysokim współczynniku umieralności. Wznovy są leczone głównie za pomocą chemioterapii, aż do czasu wykształcenia się oporności, **dlatego uważam, że praca doktorska mgr Zofii Łapińskiej dotyczy bardzo aktualnego i ważnego kierunku badań.**

Ponadto, badania te wpisują się ściśle w aktualne kierunki badawcze, o czym świadczy m.in. finansowanie uzyskane z Narodowego Centrum Nauki w konkursie SONATA BIS 6 i DAINA 2 na realizację projektów, których kierownikiem była Pani prof. dr hab. inż. Julita Kulbacka oraz Grant Litewskiej Rady ds. Badań Naukowych, którego kierownikiem był Prof. Vitalij Novickij.

Biorąc pod uwagę fakt, że stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej prace przeszły przez krytyczny systemem oceny *peer-review* podczas publikacji w recenzowanych czasopismach z listy *Journal Citation Reports*, można być pewnym, że opublikowane badania są oryginalne, mają wpływ na rozwój dyscypliny naukowej i są zgodne z najlepszymi praktykami w danej dziedzinie.

Doktorantka jasno i precyzyjnie sformułowała cel pracy, którym była ocena efektywności połączenia elektroporacji z jonami wapnia w kontekście eliminacji komórek raka jajnika na zróżnicowanych modelach *in vitro*. **Należy zauważyć, że cel ten został zrealizowany.**

W pracy przeglądowej z roku 2022 pt. ” *Electroporation and Electrochemotherapy in Gynecological and Breast Cancer Treatment* Doktorantka opisuje aktualny stan wiedzy na temat podstawowych mechanizmów odpowiedzialnych za przebieg terapii opartych na elektroporacji oraz aktualnego stanu wiedzy w zakresie ich zastosowania w leczeniu nowotworów ginekologicznych.

W pracy badawczej z roku 2020 pt. „ *Electrochemotherapy with Calcium Chloride and 17 β -Estradiol Modulated Viability and Apoptosis Pathway in Human Ovarian Cancer* ” Doktorantka wykazuje, że wstępna preinkubacja komórek raka jajnika (MDAH-2774) z 17 β -estradiolem (10 μ M) może skutecznie wzmocnić chemio- i elektrochemioterapię (ECT) z cisplatyną lub chlorkiem wapnia przeprowadzaną w warunkach *in vitro*. Co ciekawe, estradiol (E2) zmniejszał skuteczność elektroporacji, co może sugerować inny niż związany ze zmianą przepuszczalności błony komórkowej mechanizm zwiększania skuteczności ECT przez E2. W badaniach wykorzystano różne czasy trwania impulsów elektrycznych, w tym w zakresie mikrosekund jak i nanosekund o określonych parametrach.

Lektura tej pracy rodzi pytanie jak preinkubacja z $10\mu\text{M}$ E2 miałyby wspomóc ECT klinicznie? Do testów w hodowli komórkowej *in vitro* z naukowego punktu widzenia, wybór najwyższego, nietoksycznego stężenia substancji może wydawać się słuszny, ale *in vivo* nawet krótka ekspozycja pacjentek na stężenie $10\mu\text{M}$, które przewyższa stężenie fizjologiczne o co najmniej 3 rzędy wielkości, może mieć poważne niepożądane skutki uboczne. Należy pamiętać, że receptory dla estradiolu występują na wielu komórkach i mogą być one bardziej wrażliwe.

W kolejnej pracy badawczej z 2023 r. „*The influence of asymmetrical bipolar pulses and interphase intervals on the bipolar cancellation phenomenon in the ovarian cancer cell line*„ Autorka zbadała efektywność działania impulsów elektrycznych dostarczanych w 10-impulsowych seriach, ale jako sekwencje jedno- lub dwubiegunowe, symetryczne lub asymetryczne o określonych parametrach bez i w połączeniu z jonami wapnia na komórki raka jasnokomórkowego jajnika (OvBH-1). Wyniki uzyskane przez Doktorantkę potwierdzają, że zjawisko zniesienia działania impulsu elektrycznego przez zastosowanie impulsu o odwrotnej polaryzacji można kontrolować za pomocą asymetrii impulsu lub opóźnienia między dodatnią i ujemną polaryzacją impulsu, co ma istotne znaczenie, bo wpływa na końcowy biologiczny efekt zjawiska i w konsekwencji samej terapii.

Do najważniejszych i ciekawych wyników pracy doktorskiej Pani Zofii Łapińskiej zaliczyć należy:

- Potwierdzenie, że elektrochemioterapia działa efektywniej niż chemioterapia na komórki raka jajnika
- Wykazanie, że elektroporacja z jonami wapnia lub cisplatyną działa efektywniej na komórki rakowe niż prawidłowe komórki nabłonka jajnika
- Wykazanie, że zastosowanie impulsów asymetrycznych zmniejsza efekt zniesienia działania impulsu elektrycznego przez zastosowanie impulsu o odwrotnej polaryzacji tzw. *bipolar cancellation*
- Wykazanie, że estradiol w stężeniu $10\mu\text{M}$ uwrażliwia komórki nowotworowe na terapię oparte na elektroporacji.

Niestety, spore zastrzeżenia budzi poprawność formalno-językowa polskiej części rozprawy oraz umiejętność posługiwania się terminologią danej dyscypliny. Czytając tę część pracy odnosi się wrażenie, że Doktorantka nie potrafi w sposób poprawny opisać swoich badań w języku polskim. Wiele sformułowań jest niejasnych i nieprecyzyjnych. Wymieniam tylko niektóre z nich:

- (a) W streszczeniu: „efektywność zależy od długości czasu trwania impulsu, polarności oraz symetryczności zastosowanych protokołów”
- (b) W hipotezie: „Zastosowanie protokołów asymetrycznych powoduje ograniczeniem tego zjawiska”,
- (c) W rozdz. 6.6: ”W tym celu wykorzystano metodę kometową, cytometrii przepływową oraz (*dane nieopublikowane*).”
- (d) „rozpatrując wpływ symetryczności protokołu”.

Ponadto, Doktorantka wielokrotnie pisze, że „nasadza komórki” czy „leczy komórki”, „zaaplikowane leczenie”, takie stwierdzenie byłoby poprawne, gdyby komórki były leczone np. z mycoplasmy.

W pracy występują liczne błędy i anglicyzmy np.: „media hodowlane”, „figury”, błędy literowe, np. „impulsywnego pola elektrycznego”, „impulsowane pole”, „przeciwciałami przeciwko IgGk BP-HRP-mysiemu”, stylistyczne oraz frazeologiczne np. „wkroczenie na drogę śmierci komórkowej”, „komórki znajdują się na wyposażeniu Katedry”, „Procent permeabilizacji wyrażano jako liczbę komórek emitujących fluorescencje”, „... akumulacja cytoszkieletu w części centralnej”, „... przy użyciu testu MTT, który identyfikuje aktywność mitochondriów”, „w aspekcie efektywności elektroporacji ...”.

Praca sprawia wrażenie językowo nieprofesjonalnej, amatorskiej, przygotowanej w pośpiechu, co negatywnie odbiło się na jej jakości edytorskiej, natomiast wysoko oceniam oryginalność podjętego przez Doktorantkę problemu badawczego, a poczynione obserwacje stwarzają nowe możliwości terapeutyczne, które powinny być w dalszej perspektywie przetestowane na modelach przedklinicznych.

Ocena metodologiczna

Lektura wstępu oraz opublikowanej pracy przeglądowej w *Molecules* opartej na przeglądzie 208 artykułów pozwala stwierdzić, że Pani mgr Zofia Łapińska sprawnie porusza się w tematyce zastosowania elektroporacji szczególnie w kontekście wykorzystania tej techniki w leczeniu nowotworów ginekologicznych (raka jajnika i piersi).

Doktorantka stawia hipotezy badawcze i stosuje poprawny dobór narzędzi badawczych i metod, choć w przypadku ECP, testy żywotności powinny raczej opierać się o te związane z integralnością błony komórkowej niż aktywnością mitochondrialną. Test MTT może wciąż wskazywać aktywność mitochondrialną nawet w przypadku komórek z uszkodzoną błoną komórkową. Zebrane wyniki potwierdzają umiejętność zastosowania opisanych w pracy metod.

Zastanawia dobór linii komórkowych. W badaniach wykorzystano rzadkie formy nowotworu epitelialnego jajnika: endometrialny MDAH-2774 i jasnokomórkowy OvBH-1. Zgodnie z klasyfikacją WHO, głównym typem raka epitelialnego jajnika jest rak surowiczy, stanowiący ok 70% przypadków. Dlaczego jako kontrolę wybrano nabłonek jajnika chomika, skoro jest dostępna ludzka linia - Human Ovarian Surface Epithelial Cells (*HOSEpiC*)?

W pracy brakuje też pokazania ekspresji ESR α i ESR β , GPER dla stosowanych modeli badawczych.

Chociaż rozprawa ma typowy układ, to brakuje w niej rozdziałów: dyskusja i dalsze perspektywy badań. Podsumowanie i wnioski powinny być zwięzłym opisem. W tym przypadku otrzymujemy także 10 rycin prezentujących dodatkowe, nieopublikowane przez Doktorantkę wyniki. Niezaprzeczalnie jest to ważny dodatek i uzupełnienie pracy, ale powinien znaleźć się raczej w oddzielnym rozdziale „wyniki”. Rozdział „spis załączonych w pracy figur” jest źle zatytułowany, powinno być rysunków bądź rycin. Ponadto, mały rozmiar rysunków (4, 6, 7), elementów graficznych na nich i zdjęć mikroskopowych wymagają dopatrywania się szczegółów czy różnic. Na Rys 9 to średnia z dwóch niezależnych doświadczeń czy pomiarów technicznych? Robienie statystyki z takiej liczby powtórzeń jest nieuprawnione, właściwsze byłoby zamieszczenie obu wyników z niezależnych doświadczeń.

Niewątpliwie słabą stroną rozprawy doktorskiej jest brak wspólnej dyskusji wszystkich uzyskanych wyników. W opinii recenzenta jest to bardzo ważny rozdział, pomimo, że każda z publikacji posiada odrębną dyskusję. Dyskusja powinna zwierać koncepcję pracy naukowej i stanowić logiczne ich następstwo, dlatego też wskazuje czy Autor dysertacji potrafi w sposób spójny przedstawić wspólną analizę wszystkich uzyskanych wyników badań. Podjęcie próby przedyskutowania wszystkich zebranych wyników potwierdziłoby dojrzałość naukową Doktorantki.

Pomimo powyższych uwag, pozytywnie oceniam dobór warsztatu metodologicznego.

Na uwagę zasługuje wyróżniająca się sylwetka Doktorantki. Pani mgr Zofia Łapińska jest współautorem 10 prac naukowych, 2 rozdziałów monograficznych oraz 16 komunikatów zjazdowych. Była wykonawcą w 4 projektach i członkiem w Studenckim Kole Naukowym, w Radzie Doktorantów, Zespole ds. Jakości Kształcenia, co świadczy o jej dużym zaangażowaniu i aktywności nie tylko naukowo-badawczej, ale i organizacyjnej.

Podsumowanie

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska autorstwa Pani mgr Zofii Łapińskiej spełnia warunki określone w art. 187 ust.1i2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1668 ze zm.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie rozprawy mgr Zofii Łapińskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



Agnieszka Wolnicka-Głubisz