

Sosnowiec, 11.05.2020r.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpl. dnia	18 -05- 2020
L. dz. RN-BM/	412

**Dr hab. n. med. Wojciech Kaspera**  
**Oddział Kliniczny Neurochirurgii**  
**Katedry Neurochirurgii**  
**Śląski Uniwersytet Medyczny**  
**Wydział Nauk Medycznych w Katowicach**

### **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Olgi Michel**

**pt.: "Ocena efektywności elektroporacji z wybranymi związkami przeciwnowotworowymi wobec ludzkich komórek raka trzustki"**

Promotor: dr hab. inż. Julita Kulbacka

Oddział Kliniczny Neurochirurgii  
Katedry Neurochirurgii  
Śląski Uniwersytet Medyczny  
Wydział Nauk Medycznych  
w Katowicach

41-200, Sosnowiec  
Pl. Medyków 1  
www.sum.edu.pl

SEKRETARIAT

tel.: (+48 32) 368-25-51

fax: (+48 32) 368-20-24  
sekr\_nch@wss5.pl

Rak trzustki jest jednym z najczęściej występujących nowotworów przewodu pokarmowego i równocześnie jednym z najgorzej rokujących. Odsetek chorych przeżywiających 5 lat od rozpoznania nie przekracza 5%. Z uwagi na początkowo bezobjawowy proces rozrostu guza rozpoznawany jest późno i najczęściej nie kwalifikuje się do chirurgicznego usunięcia. W momencie rozpoznania raka trzustki jedynie u 10-20% pacjentów możliwe jest leczenie chirurgiczne. Mediana czasu przeżycia u tych chorych wynosi 15-19 miesięcy. W związku z dużym odsetkiem nawrotów u chorych poddanych pierwotnie leczeniu chirurgicznemu dużego znaczenia nabiera leczenie uzupełniające. Obecnie standardem w leczeniu uzupełniającym raka trzustki wpływającym na wydłużenie czasu przeżycia jest zastosowanie gemcytabiny lub fluorouracylu, a w przypadku zaawansowanego stadium choroby chemioterapii wielolekowej według schematu FOLFIRINOX. Z uwagi jednak na słabe unaczynienie guza, tendencję do szybkiej progresji nowotworu oraz oporność na leki cytostatyczne również chemioterapia nie przekłada się na znaczące wydłużenie czasu ani jakości przeżycia. Ograniczona skuteczność działania gemcytabiny i innych stosowanych w leczeniu raka trzustki

chemoterapeutyków związana jest między innymi z tzw. reakcją desmoplastyczną. W jej wyniku w guzie powstaje tzw. stroma nowotworowa, będąca swego rodzaju blizną, tworzącą specyficzne mikrośrodowisko guza. W przypadku raka trzustki stroma może stanowić nawet ponad 80% masy guza. Jej obecność nie tylko upośledza dostarczenie leków do komórek nowotworowych, ale także stymuluje powstawanie komórek-mutantów zdolnych do tworzenia przerzutów. **W związku z tym istnieje pilna potrzeba opracowania nowych metod postępowania dla tej grupy chorych.** Jedną z takich nowych obiecujących, ale pozostających jeszcze w fazie pierwszych badań klinicznych metod terapeutycznych jest elektrochemioterapia (ECT). **ECT jest połączeniem chemioterapii i techniki elektroporacji błon komórkowych.** Podstawą elektroporacji jest wykorzystanie impulsowego pola elektrycznego w celu zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych dla cytostatyków. Utworzone na skutek depolaryzacji błony komórkowej elektropory umożliwiają swobodną dyfuzję podawanych dożylnie leków do cytoplazmy komórek nowotworowych. W ten sposób miejscowo uzyskuje się wysokie, nieosiągalne innymi metodami stężenia leków przeciwnowotworowych, dzięki czemu wielokrotnie wzrasta ich cytotoksyczność. Przedstawiona do recenzji **rozprawa doktorska Pani mgr Olgi Michel doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy, ponieważ podjęto w niej szereg zagadnień mających istotną wartość dla poprawy wyników leczenia chorych z rakiem trzustki poddanych adjuwantowej chemioterapii.**

Rozprawę doktorską Pani mgr Olgi Michel stanowi spójny tematycznie cykl 4 pełnotekstowych artykułów naukowych opatrzony wspólnym tytułem **“Ocena efektywności elektroporacji z wybranymi związkami przeciwnowotworowymi wobec ludzkich komórek raka trzustki”**. W skład cyklu wchodzi następujące publikacje:

I. Praca pogłówna

**1. Olga Wysocka**, Julita Kulbacka, Jolanta Saczko (2016). "Adjuvant, neoadjuvant, and experimental regimens in overcoming pancreatic ductal adenocarcinoma." *Przegląd gastroenterologiczny*, 2016, T.11 nr 3; s.155-162. (MNiSW: 14).

II. Prace oryginalne

**1. Olga Michel**, Julita Kulbacka, Jolanta Saczko, Justyna Mączyńska, Piotr Błasiak, Joanna Rossowska, Adam Rzechonek (2018). Electroporation with cisplatin against metastatic pancreatic cancer: In vitro study on human primary cell culture. *BioMed Research International*, Vol.2018; art.7364539. (IF: 2,197, MNiSW: 25).

**2. Olga Michel**, Dawid Przystupski, Jolanta Saczko, Anna Szewczyk, Natalia Niedzielska, Joanna Rossowska, Julita Kulbacka (2018). The favourable effect

of catechin in electrochemotherapy in human pancreatic cancer cells. *Acta Biochimica Polonica*, 2018, 201865(2), 173-184. (IF: 1,626, MNiSW:15)

3. **Olga Michel**, Andrei Pakhomov, Maura Casciola, Jolanta Saczko, Julita Kulbacka, Olga Pakhomova (2019). Electroporation does not correlate with plasma membrane lipid oxidation. *Bioelectrochemistry*, 107433. (IF: 4,474, MNiSW:100).

Przedstawiony cykl publikacji został wykonany pod kierunkiem naukowym promotora dr hab. inż. Julity Kulbackiej i powstał w latach 2016 – 2020r. Łączny IF dla całego cyklu publikacji wyniósł 8,297 (łączna liczba punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) - 54 pkt MNiSW za prace opublikowane przed 31 lipca 2019 roku; 100 pkt MNiSW za pracę opublikowaną po 31 lipca 2019 roku). Wszystkie prace zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych i stanowią logiczny ciąg służący realizacji postawionego w celu pracy zadania jakim była weryfikacja na modelu *in vitro* skuteczności ECT w zwalczaniu komórek raka trzustki. **We wszystkich w/w artykułach Doktorantka jest pierwszym autorem.** Należy zatem uznać, że Jej wkład w przygotowaniu wszystkich publikacji był dominujący, co potwierdzone zostało również stosownymi oświadczeniami współautorów, zamieszczonymi na końcu pracy doktorskiej.

Sama dysertacja posiada zwartą, proporcjonalną budowę, zgodną z obowiązującymi kanonami dla pracy doktorskiej i zawiera:

- **streszczenie** w języku polskim oraz angielskim,
- **wstęp** wraz celami pracy, podsumowaniem oraz wnioskami,
- ciekawie i klarownie zaprojektowany **abstrakt graficzny**,
- **oryginały czterech** składających się na dorobek Doktorantki **publikacji**,
- **wykaz dorobku naukowego** Doktorantki,
- zgodę komisji bioetycznej na badania,
- oraz **oświadczenia współautorów** prac będących podstawą cyklu.

We **wstępie** Doktorantka przedstawiła po krótko problematykę związaną z późnym rozpoznaniem raka trzustki oraz złą odpowiedzią na współczesne metody terapii adjuwantowej u chorych poddanych resekcji guza lub terapii paliatywnej w przypadkach guzów nieoperacyjnych. W tej części dysertacji opisano również zwięźle samo zjawisko elektroporacji oraz jego zastosowanie w biotechnologii. Następnie Doktorantka omówiła perspektywy związane z wykorzystaniem tej techniki w połączeniu ze standardową chemioterapią w terapii nowotworów. Podkreśliła słabe poznanie mechanizmów elektroporacji, w tym między innymi mechanizmów tworzenia

porów w komórkach znajdujących się w polu elektrycznym oraz brak standaryzacji tej metody w kontekście wykorzystania jej w terapii konkretnego nowotworu. W tym rozdziale jasno sformułowane zostały również cele pracy, które obejmowały i) określenie wrażliwości na działanie impulsowego pola elektrycznego komórek raka trzustki na modelu *in vitro*; ii) ocenę skuteczności ECT do zwiększenia odpowiedzi komórek raka trzustki o różnym stopniu lekooporności na działanie cisplatyny; oraz iii) ocenę odpowiedzi błon komórkowych raka trzustki na elektroporację poprzez zastosowanie katechiny; a także iv) wykazanie związku przyczynowego między peroksydacją lipidów a elektropermeabilizacją. W dalszej części **wstępu** Doktorantka przechodzi do omówienia publikacji składających się na cykl będący Jej osiągnięciem naukowym.

**Pierwsza z publikacji** zatytułowana „*Adjuvant, neoadjuvant, and experimental regimens in overcoming pancreatic ductal adenocarcinoma*” to praca poglądowa.

W publikacji tej Doktorantka omawia epidemiologię raka trzustki, następnie przechodzi do obowiązujących schematów leczenia tj. chirurgicznego oraz terapii adjuwantowej. W tej części przedstawia szczegółowo schematy chemioterapii oparte bądź to na wykorzystaniu pojedynczego leku bądź terapii wielolekowej oraz kombinacji chemio- i radioterapii. W odrębnym podrozdziale omówione zostały również perspektywy wykorzystania terapii neoadjuwantowej w leczeniu raka trzustki.

Publikacja powstała w oparciu o 77 pozycje literaturowe i w sposób wyczerpujący omawia zagadnienia związane z leczeniem różnych pod względem zaawansowania postaci raka trzustki. **Stanowi ona świetne uzasadnienie dla koncepcji prowadzenia dalszych badań, stawia bowiem pytania o nowe możliwości terapii raka trzustki, w świetle niezadawalających obecnie wyników jego leczenia.**

Doktorantka wprowadza nas w podstawy teoretyczne działania elektroporacji, wskazując na dwa podstawowe kierunki jej działania tj. eliminacji komórek raka poprzez nieodwracalną elektroporację (IRE) ich powierzchni oraz ułatwienie przenikania przez błonę komórkową dużych molekuł, w tym między innymi leków cytotoksycznych. W dalszej części artykułu omawia doniesienia, które wskazują, że IRE może być z powodzeniem stosowana jako jedna z opcji paliatywnego leczenia zaawansowanych postaci raka nerek, płuc i trzustki. W ostatniej części artykułu cytuje wyniki aktualnie prowadzonych wysoce obiecujących badań na wykorzystaniem ECT w terapii powierzchniowo położonych guzów. We wnioskach podkreśla, że brak jest aktualnie dużych randomizowanych prospektywnych badań klinicznych weryfikujących jej wykorzystanie w raku trzustki. Stąd konieczne staje się stworzenie podstaw teoretycznych zastosowania tej metody w oparciu o wyniki badań przedklinicznych *in vitro* na pierwotnych liniach komórkowych raka trzustki.

**W drugiej z cyklu publikacji** pt. „*Electroporation with cisplatin against metastatic pancreatic cancer: In vitro study on human primary cell culture*” celem było

porównanie wrażliwości ludzkich komórek gruczolaka trzustki na cisplatynę podaną w formie inkubacji lub ECT *in vitro*. Doktorantka oraz współautorzy publikacji dokonali rzeczowej oceny otrzymanych wyników, przedstawiając przy tym dojrzałą i twórczą dyskusję. W badaniach wykorzystano dwie ustalone linie raka trzustki o różnym stopniu oporności na daunorubicynę (linia pierwotna EPP85-181P, linia oporna na daunorubicynę EPP85-181RDB). I co istotne, Doktorantka wykorzystwała również w badaniach nowo wyprowadzoną pierwotną linię z fragmentu guza – przerzutu raka trzustki, pobranego śródoperacyjnie. Pierwotne nowotworowe linie komórkowe w znacznie większym stopniu odzwierciedlają cechy fenotypowe i genotypowe obserwowane *in vivo*. W pracy wykazano, iż komórki z hodowli pierwotnej cechują się wyższą opornością na cisplatynę ale jednocześnie są bardziej wrażliwe na działanie ECT. Zwiększenie bowiem, transportu leku poprzez elektropermeabilizację pozwoliło na obniżenie przeżywalności komórek w hodowli. W przypadku ustalonych linii komórkowych obserwowano znacznie słabszą odpowiedź na ECT. Po zastosowaniu ECT wykazano również wzrost aktywności mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej oraz immunoreaktywności kaspazy 3, co najprawdopodobniej związane było z powstaniem stresu oksydacyjnego oraz rozpoczęciem procesów apoptotycznych.

Szkoda, że w zaprezentowanych w tej pracy badaniach Doktorantka, nie zdecydowała się na bardziej dogłębne scharakteryzowanie nowo pozyskanej linii pierwotnej i porównania jej tożsamości z materiałem pobranym śródoperacyjnie, przy pomocy standardowo wykorzystywanej dziś metody STR (krótkie powtórzenia tandemowe). Ciekawe, byłoby także wykorzystanie do określenia odpowiedzi na ECT i) linii opornej na cisplatynę, oraz ii) modelu sferoidów lub organoidów, bowiem modele te w lepszy sposób odzwierciedlają odpowiedź terapeutyczną niż jednowarstwowe hodowle komórkowe. W badaniach cytotoksyczności, warto byłoby również wyznaczyć stężenie IC<sub>50</sub>, a wyniki immunocytochemii potwierdzić metodą Western blot lub cytometrią przepływową, które pozwoliłyby nieco szerzej zbadać mechanizm odpowiedzi testowanych komórek na ECT. I już uwaga czysto estetyczna, większe powiększenie komórek na Rycinie 6 lepiej pozwoliłoby dostrzec zmiany w aktywacji SOD-2 oraz kaspazy-6 w odpowiedzi na zadane czynniki terapeutyczne.

**W publikacji trzeciej pt. „*The favourable effect of catechin in electrochemotherapy in human pancreatic cancer cells*”** szczegółowo opisano w jaki sposób można zwiększyć efektywność ECT przy pomocy związku pochodzenia naturalnego – katechiny. W badaniach wykorzystano dwie linie komórkowe: pierwotną linię raka trzustki (EPP85-181P) oraz linię komórkową o wyindukowanej oporności wielolekowej (EPP85-181RNOV). Wykazano, że inkubacja komórek z katechiną prowadzi do odmiennej odpowiedzi komórek obu linii na ECT. Co więcej, Doktorantka wykazała, iż w przypadku linii EPP85-181RNOV katechyna prowadzi do zwiększenia

skuteczności metody ECT. Ponadto, wykorzystując dwa znaczniki fluorescencyjne, jodek propidyny (PI) oraz daunorubicynę, udowodniła, że inkubacja komórek z katechiną przed zastosowaniem ECT prowadzi do zwiększonego gromadzenia się daunorubicyny w komórkach. Podobnego efektu nie obserwowwała natomiast dla PI, co sugerowałoby, iż mechanizm działania katechiny jest specyficzny dla danego związku. Rezultaty oraz Dyskusja w pracy zostały opisane w sposób prawidłowy i bardzo szczegółowy. W części dotyczącej wyników pracy zabrakło mi jednak statystycznej analizy pomiędzy grupami np. na Rycinie 8, porównanie grup EP i CisEP (w obecności i w/o katechiny) byłoby bardziej informatywne, niż odniesienie każdej z grup traktowanych katechiną do kontroli nietraktowanej. Ponadto, Doktorantka raz posługuje się w przypadku testu przeżywalności MTT opisem: aktywność mitochondrialna a raz przeżywalność (oś y Rycina 7 oraz Rycina 8), co należałoby także ujednotwić. Korzystne byłoby także dodanie w eksperymentach określających produkcję ROS, grupy traktowanej inhibitorem ROS jak np. N-Acetylo-Cysteiną (NAC). Na Rycinie 9, ze względu na różną wrażliwość badanych komórek na przyłożone pole elektryczne, wykresy A i B należałoby znormalizować do grupy 0 V/cm, co pozwoliłoby na bezpośrednie porównanie przepuszczalności przez błonę komórkową pomiędzy liniami komórkowymi. I ostatnia drobna uwaga, w wynikach cytometrii przepływowej na histogramach nie zostały opisane osie (Rycina 9 oraz Rycina 10).

**Ostatnia z publikacji pt. „*Electropermeabilization does not correlate with plasma membrane*”** stanowi zwieńczenie cyklu. Jej celem było zweryfikowanie hipotezy o pozytywnym związku między zjawiskiem elektroporacji a utlenieniem lipidów w błonie komórkowej. Mechanizm ten w opinii części badaczy jest odpowiedzialny za długotrwałe otwarcie porów w dwuwarstwach lipidowych błony komórkowej. Do identyfikacji zjawiska utlenienia lipidów w błonie komórkowej zastosowano nowatorską metodę, wykorzystującą barwnik fluorescencyjny C11-BODIPY (581/591) w połączeniu z mikroskopią fluorescencyjną całkowitego wewnętrznego odbicia (TIRF), która pozwala na selektywne badanie błony komórkowej. Komórki linii CHO-K1 hodowano na specjalnie przygotowanych szkiełkach nakrywkowych, pokrytych elektroprzewodzącą substancją (ITO; tlenek cyny i indu), co umożliwiło zastosowanie ECT z wykorzystaniem mikro- oraz nanosekundowych impulsów. Co ciekawe nie obserwowano zjawiska oksydacji lipidów, gdy w badanym układzie przepływ prądu skierowany był w kierunku katody, nawet przy zastosowaniu natężeń pola elektrycznego powyżej wartości wywołujących zjawisko permeabilizacji. Przy zmienionej polarności impulsów elektrycznych, oksydacja zachodziła, ale również tylko dla wysokich natężeń prądu, powyżej wartości progowych określonych dla permeabilizacji. Badania te wykazały, iż oksydacja lipidów nie jest bezpośrednio

związana z elektroporacją a jedynie z procesami elektrochemicznymi wywołanymi polem elektrycznym o wysokim natężeniu.

**Wstęp** kończy podsumowanie wyników przeprowadzonych badań oraz ciekawie przedstawiona koncepcja pracy w postaci graficznej.

Moje pewne zastrzeżenia budzi struktura przedstawionej do recenzji dysertacji. Jakkolwiek wykorzystana do jej stworzenia forma z cyklem publikacji, który zawiera w sobie całe osiągnięcie naukowe Doktoranta utrudnia zachowanie „klasycznej” struktury z podziałem na wstęp, cele, materiał i metodykę, wyniki, dyskusję oraz wnioski, nie zwalnia to jednak Doktoranta od prób wpisania cyklu publikacji w ten „klasyczny” układ dysertacji. W dysertacji autorstwa Pani mgr Olgi Michel w rozdziale **wstęp** znalazły się wszystkie podrozdziały „klasycznej” dysertacji, w tym cele, omówienie wyników, dyskusja i wnioski. Trudno więc rozdziałowi **wstęp** w dysertacji Doktorantki przypisać jego faktyczne znaczenie. Uwaga ta ma charakter czysto edytorski i w żaden sposób nie umniejsza wartości merytorycznej całości pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

**Podsumowując stwierdzam, że spójny tematycznie cykl publikacji stanowiący rozprawę doktorską Pani mgr Olgi Michel w opracowaniu zarówno koncepcji, wykonaniu doświadczeń, jak i opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu publikacji jest oryginalnym opracowaniem dotyczącym oceny efektywności ECT w zwalczaniu komórek raka trzustki.**

Uzyskane w niej wyniki weryfikujące skuteczność ECT w zwalczaniu komórek raka trzustki *in vitro* należy ocenić bardzo wysoko również w kontekście ich potencjalnego wykorzystania w praktyce w leczeniu zaawansowanych nieresekcyjnych guzów trzustki bądź służących poprawie wyników adjuwantowej chemioterapii. Badania zawierają szereg elementów nowatorskich i zostały wykonane metodycznie poprawnie. Doktorantka przy ich opracowaniu wykazała się odpowiednią wiedzą merytoryczną oraz umiejętnością ich samodzielnego prowadzenia. **Szczególne uwagę zwraca bogaty dorobek naukowy Doktorantki, który wraz z cyklem publikacji stanowiących w/w osiągnięcie naukowe wyraża się całościowym IF=33,331 (460 pkt za prace opublikowane w latach 2019-2020 i 242pkt za prace powstałe w latach 2015-2019).** Dopelnieniem dorobku naukowego Doktorantki jest **współautorstwo 60 doniesień** zjazdowych o zasięgu krajowym i zagranicznym. Aktywność naukowa Doktorantki przyniosła również wymierne efekty w postaci **szeregu nagród i wyróżnień**, w tym na szczególne podkreślenie zasługuje stypendium Fulbright Junior Advanced Research Award, które umożliwiło jej 7 miesięczny staż badawczy w USA (edycja 2018-2019r.).

We wniosku końcowym stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska pt. "Ocena efektywności elektroporacji z wybranymi związkami przeciwnowotworowymi wobec

ludzkich komórek raka trzustki”, w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Dlatego przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki Medycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pani mgr Olgi Michel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, **z uwagi na wartość naukową rozprawy**, wielką staranność jej przygotowania, **możliwości szerokiego wykorzystania jej wyników w praktyce klinicznej**, jak również dobrą znajomość literatury przedmiotu oraz **dojrzałość naukową Doktorantki stawiam wniosek o wyróżnienie pracy.**

z poważaniem



**ADIUNKT**

Katedry i Oddziału Klinicznego Neurochirurgii  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

dr hab. n. med. Wojciech Kaspera