

Dr hab. n. med. Piotr Bryniarski FEBU, prof. SUM
Klinika Urologii Wydziału Nauk Medycznych w Zabrze
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

30 listopad 2021

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DISCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpl. dnia	09-12-2021
L. dz. RN-BiM	1828 / 2021

Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Wpływ krótkich impulsów elektrycznych na komórki raka gruczołu krokowego” autorstwa lek. Aleksandra Kiełbika

W związku z uchwałą Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu nr 299/X/2021 z dnia 21 października 2021 o powołaniu mnie na recenzenta wyżej wymienionej pracy mam zaszczyt przedstawić następującą opinię.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska wraz z streszczeniem w języku polskim oraz piśmiennictwem liczy 99 stron i składa się z cyklu trzech prac naukowych o łącznym IF: 15,429 Liczba punktów MNiSW/KBN: 380.

Eksperyment badawczy został przeprowadzony w laboratorium Katedry i Zakładu Biologii Molekularnej i Komórkowej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Doświadczenia prowadzono na komórkach raka prostaty DU 145 oraz LNCaP. Komórki te poddawano elektroporacji poprzez zastosowanie krótkich impulsów elektrycznych co doprowadzało do uszkodzenia błony komórkowej indukując proces śmierci komórki.

Obecnie w praktyce klinicznej do leczenia raka prostaty możliwe jest zastosowanie systemu do elektroporacji - Nanoknife®; Angiodynamics, Queensbury, NY, USA. Urządzenie to podaje mikrosekundowe impulsy w rejon guza powodując uruchomienie kaskady zdarzeń prowadzącą do śmierci komórkowej. W porównaniu do standardowo stosowanych sposobów leczenia raka stercza takich jak radykalna prostatektomia lub radykalna radioterapia elektroporacja ma wiele teoretycznych zalet, na które warto zwrócić uwagę. Ponieważ nie stosuje się tutaj ablacji termicznej możliwe jest zachowanie funkcji zwieraczy cewki moczowej oraz potencji u mężczyzn poddanych temu zabiegowi. Z drugiej jednak strony odsetek wznów po elektroporacji jest oceniany w zależności od badań 10,9-22,9% co jest wynikiem niezadowalającym biorąc pod uwagę, że większość chorych kwalifikowanych do tego zabiegu to pacjenci z grupy niskiego ryzyka. Wyniki te nie oddają jednak w pełni efektywności elektroporacji, gdyż jako dość nowy sposób leczenia chorych z rakiem prostaty na wyniki odległe będziemy musieli poczekać jeszcze wiele lat. Sam zabieg musi być wykonywany w znieczuleniu ogólnym ze zwiotczeniem mięśni, gdyż mikrosekundowe impulsy (w odróżnieniu od nanosekundowych) mogą powodować skurcze mięśni poprzecznie-prążkowanych.

Lek. Aleksander Kiełbik postawił sobie za zadanie:

1. Ocenić skuteczność elektroporacji po zastosowaniu nanosekundowych impulsów, gdyż mają one podobny efekt cytotoksyczny, lecz mogłyby w praktyce klinicznej wyeliminować konieczność zastosowania znieczulenia ogólnego oraz zwiotczenia pacjentów.

2. Zwiększyć skuteczność (czyli cytotoksyczność) elektroporacji poprzez zastosowanie jonów wapnia
3. Zwiększyć skuteczność elektroporacji poprzez zwiększenie natężenie pola elektrycznego jak i częstotliwości impulsów
4. Zbadać mechanizm śmierci komórkowej wywołanej impulsami elektrycznymi
5. Ocenić skuteczność elektroporacji na podstawie mobilności komórek nowotworowych (co jest ekwiwalentem potencjału do tworzenia przerzutów nowotworowych) oraz zbadać wpływ zmian indukowanych elektroporacją w cytoszkieletcie komórek na ich mobilność.

Do oceny stopnia elektroporacji wykorzystano cytometrię przepływową. Permeabilizacja błon komórkowych powoduje, że fluorescencyjny barwnik wnika do komórek, a ich odsetek wśród całej populacji mówi o skuteczności zabiegu. Do oceny przeżywalności wykorzystano test MTT.

Analiza mechanizmu śmierci komórkowej została przeprowadzona z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, mikroskopii konfokalnej oraz testu luminescencyjnego.

Analizę mobilności komórkowej dokonano poprzez obserwację tempa zarastania wolnej przestrzeni pomiędzy dwoma koloniami komórkowymi przy pomocy programu ImageJ.

Do oceny zmian białek cytoszkieletu wykorzystano mikroskopię konfokalną.

Doktorant na podstawie wyników przeprowadzonego eksperymentu wykazał, że:

1. Elektroporacja impulsami nanosekundowymi jest skuteczną formą indukowania śmierci komórkowej
2. Zastosowanie dodatkowo jonów wapnia zwiększa skuteczność zastosowanej elektroporacji
3. Zwiększenia natężenia pola elektrycznego oraz częstotliwości impulsów zwiększa skuteczność zabiegu
4. Mechanizm śmierci komórkowej wywołanej impulsami elektrycznymi różni się w zależności od długości impulsu oraz obecności jonów wapnia w płynie zewnątrzkomórkowym
5. Elektroporacja zmniejsza mobilność komórek nowotworowych, co może mieć wpływ na ograniczoną możliwość przerzutowania raka stercza
6. Co ciekawe, nie wykazano zależności przyczynowo-skutkowej między zmianami w cytoszkieletcie a mobilnością komórek nowotworowych. Fakt ten sugeruje, że ograniczona mobilność tych komórek może również wynikać z innych zaburzeń generowanych przez elektroporację

W mojej opinii temat, którego podjął się doktorant jest bardzo aktualny i odnosi się do najnowszych technik stosowanych w medycynie. Nie dość, że analizowane w tej pracy zagadnienia dopiero zaczęły być stosowane w praktyce to doktorant już analizuje jak zwiększyć ich wydajność. Już pobieżna analiza wyników skłania do optymistycznego patrzenia w przyszłość zastosowanej elektroporacji. Uzyskane przez doktoranta wyniki na pewno skłonią producentów narzędzi do elektroporacji do wyprodukowania sprzętu stosowanego w praktyce urologicznej. Doktorant bardzo sprawnie i przystępnie opisał wyniki swoich badań. Język ten jest zrozumiały, poprawny stylistycznie z prawidłową interpunkcją. Na uwagę zasługuje prawidłowy dobór piśmiennictwa. Ponieważ temat elektroporacji jest relatywnie nowy, co za tym idzie piśmiennictwo jest bardzo aktualne. Z

przedstawionych mi do recenzji prac naukowych od razu widać, że doktorant świetnie sobie radzi z zaplanowaniem, przeprowadzeniem oraz opracowaniem nawet bardzo trudnych zagadnień. Doktorant wykorzystuje najbardziej wymagające narzędzia badawcze w tym cytometrię przepływową, mikroskopię konfokalną, testy luminescencyjne a nawet dynamikę molekularną. Na szczególne uznanie zasługuje fakt, że praca jest finansowana z narodowych i zagranicznych grantów.

Nie mam żadnych uwag co do metodologii badań, jednak jedna rzecz zasługuje na komentarz. Doktorant we wstępie pisze, że wg wytycznych Europejskiego Towarzystwa Urologicznego (EAU) w przypadku nowotworów o niskim lub pośrednim ryzyku ograniczonego do narządu możliwe jest wykorzystanie terapii fokalnych (w tym elektroterapii). Doktorant powinien tu jednak dodać, że EAU dopuszcza stosowanie terapii fokalnych tylko w ramach badań klinicznych, a nie rutynowego stosowania. Na chwilę obecną jest zbyt mało silnych dowodów klinicznych na skuteczność tych terapii.

Wszystkie powyższe fakty skłaniają mnie nie tylko do wystawienia pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej lek. Aleksandra Kiełbika, ale też wnioskuję o jej wyróżnienie.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2018 poz. 1668). W związku z tym pozwalam sobie przedłożyć Wysockiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. Aleksandra Kiełbika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

2329550

Dr hab. n. med. prof. SUM
Piotr Bryniarski
specjalista urolog FEBU