

Warszawa, 15.09.2017 r.

Prof. dr hab. inż. Tadeusz Pałko  
Instytut Metrologii i Inżynierii Biomedycznej  
Politechniki Warszawskiej  
ul. Św. A. Boboli 8  
02-525 Warszawa

*adres prywatny:*  
*Gorlicka 15 A m. 10*  
*02-130 Warszawa*

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Krzysztofa Bilmina  
p.t. **„Badanie wpływu fal ultradźwiękowych i efektu sonodynamicznego na żywotność komórek szczyrzych linii glejaków *in vitro*”**

Niniejsza recenzja została opracowana, w związku z powołaniem mnie na recenzenta tej rozprawy przez Radę Naukową Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii im. gen. Karola Kaczkowskiego w Warszawie na posiedzeniu w dniu 31.05.2017r. oraz zgodnie pismem z dnia 6.07.2017r. w tej sprawie.

Fotodynamiczne metody diagnostyki i terapii nowotworów należą do znaczących i spektakularnych osiągnięć biologii i medycyny XX wieku. Metody te są małoinwazyjne i polegają na wizualizacji i selektywnym niszczeniu tkanek nowotworowych, po wprowadzeniu do nich specjalnych substancji fotouczulających i ich naświetleniu odpowiednim promieniowaniem optycznym, najczęściej laserowym. Świecenie komórek nowotworowych, w wyniku zjawiska luminescencji wywołanej przechodzeniem fotouczulacza, po jego naświetleniu, ze wzbudzonego stanu singletowego do stanu podstawowego jest wykorzystywane jako fotodynamiczna metoda diagnostyczna (PDD- PhotoDynamic Diagnosis). Proces fotodynamicznego leczenia (PDT- PhotoDynamic Therapy) polega na niszczeniu tkanki nowotworowej w wyniku jej fotoutleniania zależnego od stopnia wzbudzonego fotouczulacza (fotoreakcja I typu) lub zależna od stężenia tlenu w środowisku reakcji (fotoreakcja II typu). Należy podkreślić, że proces PDT jest skuteczną i nowoczesną metodą leczenia wielu typów nowotworów, natomiast w wyniku jej stosowania klinicznego od 1978r. wiadomo też, że jest mało skuteczną metodą leczenia glejaków, podobnie do innych obecnie stosowanych metod. Z tych też względów, w wielu ośrodkach naukowych czynione są wysiłki w celu znalezienia skuteczniejszych od obecnie stosowanych metod leczenia tego

groźnego schorzenia. Między innymi duże nadzieje pokładane są na wykorzystaniu metody terapii sonodynamicznej, wykazanej i opisanej po raz pierwszy w publikacji z 1990r. przez Umemura i wsp., polegającej na synergicznym działaniu fal ultradźwiękowych i hematorfiryny jako sonouczulacza, w celu selektywnej likwidacji komórek nowotworowych na mysim modelu mięsaka. W ostatnich latach wiele ośrodków naukowych zajmuje się rozwojem metod terapii sonodynamicznej dla wielu typów nowotworów.

Tematyka niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczy badania wpływu fal ultradźwiękowych oraz efektu sonodynamicznego na żywotność komórek szczurzych linii glejaków *in vitro*. Zagadnienia te są ważne zarówno z punktu widzenia poznawczego, jak i utylitarne, do wykorzystania w dalszych badaniach eksperymentalnych, a następnie klinicznych. Zakres pracy oceniam jako wystarczający w odniesieniu do wymagań stawianych pracom doktorskim.

Głównym celem rozprawy, jaki postawił sobie Doktorant, były badania doświadczalne typu *in vitro* i na ich podstawie ocena wpływu oddziaływania odpowiednio wygenerowanych fal ultradźwiękowych oraz wywołanego nimi efektu sonodynamicznego, przy użyciu kwasu 5-aminolewulinowego (ALA) jako sonouczulacza na żywotność komórek szczurzych linii glejaków C6 i RG2.

Niniejsza rozprawa doktorska oparta jest na, spójnej tematycznie serii, trzech następujących publikacji zamieszczonych w czasopismach z listy filadelfijskiej, a mianowicie:

1. Kujawska T, Secomski W, Bilmin K, Nowicki A, Grieb P. Impact of thermal effects induced by ultrasound on viability of rat C6 glioma cells. *Ultrasonics*. 2014;54(5): 1366-72 (IF= 1,942- MNiSW 30),
2. Secomski W, Bilmin K, Kujawska T, Nowicki A, Grieb P, Lewin PA. In vitro ultrasound experiments: standing wave influence on the outcome. *Ultrasonics* 2017, 77; 203-213(IF=1,954 MNiSW 30),
3. Bilmin K, Kujawska T, Secomski W, Nowicki A, Grieb P. Studies of Efficacy of 5-aminolevulinic Acid-mediated Sonodynamic Therapy on Rat RG2 Glioma Cells depending on Ultrasound Acoustic Power. *Folia Neuropathologica* 54(3); 234-240, 2016 (IF =1,233 MNiSW 20).

Wymienione wyżej publikacje, na których oparto rozprawę doktorską, są wieloautorskie i mają charakter interdyscyplinarny, zwłaszcza w zakresie udziału w projektowaniu i budowie specjalistycznego stanowiska badawczego, a także w przygotowaniu eksperymentów i analizie wyników badania. Poza Doktorantem, współautorami tych publikacji byli oboje promotorzy: prof. Paweł Grieb- biolog i prof. nzw. Tamara Kujawska-elektronik, a także

dwoje wybitnych specjalistów z zakresu techniki ultradźwiękowej tj. prof. Andrzej Nowicki, dr Wojciech Secomski i dodatkowo w jednej publikacji, dr Peter A. Lewin z USA. Ze złożonych oświadczeń wszystkich współautorów tych publikacji co do zakresu ich indywidualnego wkładu w przeprowadzonych pracach wynika, że udział Doktoranta był dominujący i zgodny z wybraną dyscypliną doktoryzowania tj. biologii medycznej w dziedzinie nauk medycznych w odniesieniu do przyjętego celu i zakresu rozprawy, opracowania koncepcji badań, a także udziału w koncepcji, projekcie i budowie stanowiska badawczego oraz przeprowadzenia eksperymentów doświadczalnych, ze szczególnym uwzględnieniem efektów biologicznych oddziaływania ultradźwięków na żywotność komórek glejaków C6 i RG2 oraz analizy statystycznej wyników badań.

W badaniach linii komórkowej glejaka szczurzego C6, przeprowadzonych do publikacji 1 zastosowano sposób nadźwiękowania tych komórek w warunkach FF (Free Field), czyli niewystępowania fali stojącej i wielokrotnych odbić, przez umieszczenie głowicy ultradźwiękowej w górnej części komory do nadźwiękowania, nad płytką ze studzienkami komórkowymi. Wyniki tych badań potwierdziły, że bez stosowania sonouczulacza, głównym mechanizmem uszkadzającym komórki jest efekt umierania komórek, głównie przez indukcję apoptozy, na skutek przekroczenia ich temperatury powyżej 43° C. W badaniach do publikacji 2 użyto również komórek C6, ale porównano układ nadźwiękowania komórek w warunkach FF z układem fali stojącej i wielokrotnych odbić fali ultradźwiękowej, powstającym w warunkach SWMR (Standing Wave and Multiple Reflection), w których głowica ultradźwiękowa była umieszczana pod dnem płytki z badanymi komórkami. Okazało się, że w tym drugim przypadku do osiągnięcia 50% śmiertelności komórek wystarczało wielokrotnie mniejsze natężenie ultradźwięków, niż dla warunków FF (odpowiednio 0,32W/m<sup>2</sup> i 5,89 W/m<sup>2</sup> dla płytek 12-studzienkowych). W publikacji 3 przedstawiono wyniki badań oddziaływania ultradźwięków na komórki szczurzego glejaka RG2, z użyciem ALA jako sonouczulacza i potwierdzono wystąpienie efektu sonodynamicznego bez wystąpienia efektu toksycznej hipertermii, przy zastosowaniu mocy akustycznej ultradźwięków 6W w warunkach SWMR tj. istnienia fali stojącej i wielokrotnych odbić fali ultradźwiękowej. Wynik ten stanowi ważne osiągnięcie i zarazem pierwsze potwierdzenie wystąpienia efektu sonodynamicznego w linii komórkowej szczurzego glejaka RG2, z użyciem sonouczulacza ALA.

Przedstawiona rozprawa doktorska mgr. Krzysztofa Bilmina p.t. „Badanie wpływu fal ultradźwiękowych i efektu sonodynamicznego na żywotność komórek szczurzych linii glejaków *in vitro*” stanowi bardzo dobry, zwarty, 81 stronicowy dokument. Struktura pracy

jest przejrzysta i logiczna. Składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim oraz 7 opisowych rozdziałów, bibliografii oraz załączników. Po wprowadzeniu w problematykę rozprawy (rozd. 1), opisano wykorzystanie ultradźwięków w medycynie. Z uwzględnieniem głównych mechanizmów (termicznego, naprężeniowego i kawitacyjnego) działania na tkanki (rozd.2). Następnie opisano właściwości i zastosowania medyczne kwasu 5-aminolewulinowego (ALA), głównie jako fotouczulacza w monitorowaniu chirurgicznego usuwania nowotworów i w terapii fotodynamicznej (rozd. 3), a także metodę i zjawiska oraz zastosowania i perspektywy terapii sonodynamicznej (rozd. 4). W dalszych częściach rozprawy przedstawiono wyniki i osiągnięcia z własnych prac, związane z badaniami *in vitro* wpływu oddziaływania ultradźwięków, na żywotność linii komórkowych szczurzego glejaka C6 lub RG2, w tym na wystąpienie efektu sonodynamicznego. W tych częściach rozprawy przedstawiono cel ogólny i cele szczegółowe pracy (rozd. 5), zadania badawcze oraz istotne wyniki badań w kolejnych trzech publikacjach, na których oparto niniejszą rozprawę doktorską (rozd. 6) oraz bardzo dobrze sformułowane wnioski, wynikające z przeprowadzonych badań doświadczalnych (rozd. 7). W dalszych częściach podano dobrze dobraną bibliografię oraz na końcu załączono kopie trzech publikacji, na których oparto niniejszą rozprawę doktorską, a także oświadczenia wszystkich współautorów tych o ich indywidualnym wkładzie w przygotowanie tych publikacji.

Do szczególnych osiągnięć Doktoranta zaliczam:

1. Wkład w koncepcję, projekt i budowę specjalistycznego stanowiska badawczego,
2. Dobrze zaplanowanie i przeprowadzenie innowacyjnych eksperymentów na komórkach szczurzych linii glejaków C6 lub RG2, ze szczególnym uwzględnieniem badania efektów biologicznych oddziaływania ultradźwięków na żywotność tych komórek,
3. Stwierdzenie, że w badanym układzie eksperymentalnym szczurzego glejaka C6 bez sonouczulacza, cytotoksyczność ultradźwięków wywołana jest głównie efektami termicznymi (hipertermia), zależnymi od natężenia i czasu oddziaływania ultradźwięków a także od warunków nadźwiękowania komórek,
4. Potwierdzenie wystąpienia efektu sonodynamicznego w linii komórkowej glejaka RG2, z wykorzystaniem ALA jako sonouczulacza (publikacja 3) przy oddziaływaniu odpowiednią mocą ultradźwięków (w warunkach eksperymentu 6 W).

W trakcie czytania i analizy tekstu rozprawy dostrzeżono dwie drobne usterki redakcyjne tzw. literówki a mianowicie:

- str. 12, w 5 g – zastosowano skrót SW, a powinno być SWMR (Standing Wave and Multiple Reflections).

- str. 19, w 10 g – podano nazwę fotouczulacza „Photorfin”, a wg mojej wiedzy powinna być nazwa „Photofrin”.

Poza tymi mało znaczącymi uwagami, rozprawę doktorską oceniam jako bardzo dobrą. W ramach tej rozprawy bardzo dobrze opracowano specjalistyczne stanowiska do dedykowanych badań eksperymentalnych oraz przeprowadzono, w dużej mierze oryginalne i pozytywne badania i ocenę wpływu oddziaływania ultradźwięków o różnych parametrach fizycznych na żywotność komórek nowotworowych linii komórkowych glejaków C6 i RG2 a także wykazano i opublikowano, po raz pierwszy w skali światowej, wystąpienie efektu sonodynamicznego przy fali ultradźwiękowej o mocy 6 W, działającej w warunkach SWMR z użyciem fotouczulacza ALA, co należy uznać za wybitne osiągnięcie. Zatem przyjęty przez Doktoranta cel pracy został w pełni osiągnięty.

Reasumując uważam, że mgr inż. Krzysztof Bilmin w przedstawionej rozprawie doktorskiej rozwiązał samodzielnie postawione sobie zadanie naukowe i wykazał się wiedzą i umiejętnościami wymaganymi dla uzyskania stopnia nauk medycznych w dyscyplinie Biologia Medyczna. Rozprawa doktorska mgr. Krzysztofa Bilmina spełnia obowiązujące warunki ustawowe i w związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie ww. Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie w związku z osiągnięciem oryginalnych wyników rozprawy doktorskiej mgr. Krzysztofa Bilmina, zarówno przy opracowywaniu koncepcji projektu i budowie stanowiska badawczego a także z przeprowadzeniem oryginalnych badań wraz z analizą ich wyników, dotyczących oddziaływania ultradźwięków na żywotność komórek nowotworowych linii C6 i RG2, a również ze względu na opublikowanie uzyskanych, bardzo cennych dla biologii i medycyny, wyników badawczych zawartych zarówno w rozprawie doktorskiej jak i w trzech artykułach zamieszczonych w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym z listy filadelfijskiej tj.: 1) *Ultrasonics*. 2014;54(5): 1366-72 (IF= 1,942-MNiSW 30), 2) *Ultrasonics* 2017, 77; 203-213(IF=1,954 MNiSW 30), 3) *Folia Neuropathologica* 54(3); 234-240, 2016 (IF =1,233 MNiSW 20), stawiam wniosek o wyróżnienie tej rozprawy.

  
*prof. dr hab. inż. Tadeusz Pałko*