

Katowice, 2013-06-11

Prof. dr hab. Alicja Ratuszna

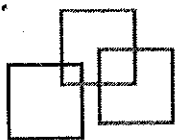
Recenzja pracy doktorskiej pani mgr Moniki Jakubowskiej
pt. *Feoforbid cynkowy jako fotouczulacz*
w terapii fotodynamicznej ludzkiego gruczolakoraka (Adenocarcinoma)
w modelu *in vitro* oraz *in vivo*

Przedstawiona do recenzji praca doktorska wykonana została w Zakładzie Biofizyki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem prof. dr hab. Krystyny Urbańskiej, w zespole posiadającym znaczące osiągnięcia na polu badań fotouczulaczy chlorofilowych w zastosowaniu do terapii fotodynamicznej nowotworów (PDT).

Tematem pracy doktorskiej było zbadanie feoforbidu cynkowego, pochodnej cynkowej chlorofilu *a*, rozpuszczalnej w wodzie, stosowanej jako fotouczulacz w terapii fotodynamicznej gruczolakoraków. W pracy przedstawiono wyniki działań feoforbidu cynkowego, uzyskanego w zespole prof. dr hab. Leszka Fiedora, na guza nowotworowego pochodzącego z ludzkiej linii nowotworowej, który wszczepiono myszom bezgrasiczym.

Rozprawa podzielona została na sześć rozdziałów (Streszczenie, Wprowadzenie, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja wyników, Wnioski), rozdziału zawierającego bogatą biografię z 147 pracami dotyczącymi omawianych zagadnień oraz suplementu, w którym opisano użyte odczynniki, leki, materiały i sprzęt oraz w tabelach podane zostały szczegółowo warunki klasyfikacji śmierci badanych komórek. Układ pracy jest dobrze dobrany, a sama praca napisana jest przejrzysto, co świadczy o znajomości tematu, którym zajmuje się Doktorantka. Badania przedstawiane w tej rozprawie były wykonywane w zespole profesor Krystyny Urbańskiej, zespole mającym światowe osiągnięcia w badaniach procesów zachodzących w komórkach nowotworowych, po zastosowaniu terapii fotodynamicznej i fotouczulaczy z rodziny chlorofilii.

Rozprawę rozpoczyna Wprowadzenie, w którym krótko opisano nowotwór gruczolakoraka, jego występowanie i stosowane metody leczenia. Następnie scharakteryzowane zostały myszy bezgra-



sicze jako najlepszy model dla guzów ludzkich. Omówiona została rola tlenu azotu w procesach zachodzących w komórkach, w warunkach stresu i jego działanie w PDT.

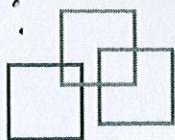
W Celach pracy, Autorka zasygnalizowała, że zajmie się sprawdzeniem efektywności terapii fotodynamicznej badanej pochodnej chlorofilu *a* wobec ludzkiego gruczolakoraka rosnącego u myszy BALB/Ca nude (bezgrasiczym). Realizację tych zadań wykonała w badaniach *in vitro*, w trakcie których wyznaczała cytotoksyczność, fotocytokosyczność, wnikanie, lokalizację wewnątrzkomórkową dla wybranych linii gruczolakoraka płuca (A549), sutka (MCF-7) i jelita grubego (LoVo) oraz ustalanie mechanizmów śmierci tych komórek w PDT.

Badania *in vivo* obejmowały opracowanie modelu i protokołu terapii fotodynamicznej, wybór tego najbardziej skutecznego protokołu i porównywanie z klinicznie stosowanym Photofrinem, określenie wpływu terapii na tworzenie przerzutów oraz ocenę poziomu tlenu azotu w guzach, po terapii PDT.

W dalszej części rozprawy przedstawiono rozdział Materiały i Metody, w którym opisano dobór linii komórkowych, zwierząt doświadczalnych, charakterystykę fotofizyczną użytych fotouczulaczy: feoforbidu cynkowego i chlorofilidu, ich przygotowanie do metody *in vitro* i *in vivo*. W części Metody Autorka pracy opisała procedury jakie zastosowała przy badaniach *in vitro*, a oceniała testy przeżywalności komórek (do badań użyto komórek A549, MCF-7, LoVo), wnikanie fotouczulacza do komórek, jego tam lokalizację, cytotoksyczność w ciemności i następnie efekt fotodynamiczny czyli po naświetleniu zlokalizowanego w guzie fotouczulacza określała ich przeżywalność stosując test MTT. Przeprowadzone zostały też obserwacje komórek poddanych naświetlaniu, oglądane pod mikroskopem jądra komórkowe klasyfikowano jako jądra komórek żywych, apoptycznych, nekrotycznych. Określano wpływ dawki światła, stężenia fotouczulacza na rodzaj śmierci.

W następnej części pracy dotyczącej badań *in vivo*, podane zostały zastosowane procedury. Odpowiednio przygotowane zawiesiny komórek nowotworowych A549 i LoVo implantowano samcom myszy BALB/cA nude, podczas gdy komórki MCF-7 implantowano samicom tych myszy. Komórki MCF-7 i LoVo podano w grupach liczących 5 zwierząt, a komórki A549 blisko 100 osobnikom, co stanowi odpowiednio dużą populację do oceny statystycznej skuteczności opisywanej terapii. Następnie opisane zostały dokładnie procedury podawania fotouczulacza zwierzętom, czasy wzrostu guza, naświetlanie narosłych guzów, dawki światła, obserwacje guzów i zwierząt po terapii, eutanazja zwierząt i pozyskiwanie materiału badawczego, jego badania metodami spektroskopowymi (mikroskopia, spektrometria fluometryczna czy elektronowego rezonansu paramagnetycznego). W sumie w protokołach PDT zbadano grupę 87 guzów o średnicach od 4 do 8 mm.

Uzyskane wyniki tak z badań *in vitro* jak i *in vivo* zostały omówione w kolejnych rozdziałach pracy Wyniki i Dyskusja wyników. W rozdziałach tych Doktorantka bardzo szczegółowo omawia przeprowadzone, zgodnie z przygotowanymi protokołami eksperymenty, tak na komórkach hodowanych *in vitro*, jak potem na guzach, które zostały implementowane myszom. Aby nie powtarzać tych opisów, przejdę do wniosków, które za Autorką wymieniam te najistotniejsze.



Otóż w podsumowaniu Autorka stwierdza, że na podstawie uzyskanych wyników badań *in vitro* jak i *in vivo* feoforbid cynkowy jest skutecznym fotouczulaczem w terapii fotodynamicznej nowotworów, gdyż:

Związek ten szybko wnika do komórek gruczolakoraków i wydajnie się w nich akumuluje, Główne miejsca lokalizacji związku jest system błon i pęcherzyków (lizosomy).

Dla stężeń terapeutycznych nie obserwowano cytotoksyczności ciemnej.

Związek wykazał silny efekt fotodynamiczny względem badanych komórek, który zależał, jak można było się spodziewać od stężenia fotouczulacza i od dawki światła.

Dla zastosowanych stężeń feoforbidu i natężenia światła, apoptoza była głównym mechanizmem śmierci badanych komórek.

Stwierdzono, że feoforbid cynkowy jest skuteczniejszym fotouczulaczem niż stosowany w terapii Photofrin

Wyniki uzyskane *in vivo* pokazały, że guz gruczolakoraka A549 rosnący u myszy BALB/cA jest odpowiednim modelem do badań dla terapii fotodynamicznej, gdyż jest dobrze przez nie przyswajalny.

Stosując terapię PDT z użyciem feoforbidu cynkowego stwierdzono istotne spowolnienie wzrostu guzów. Zaobserwowano też, po raz pierwszy, wzrost zawartości kompleksów tlenku azotu i hemoglobiny, szczególnie tam, gdzie wzrost guzów został znacznie zahamowany. Oznacza to, że pomiar nitrozyłhemoglobiny może być wskaźnikiem skuteczności terapii fotodynamicznej.

Podsumowanie:

Przedstawione wyniki dla feoforbidu cynkowego wskazują, że jest to fotouczulacz posiadający wszelkie cechy, które predysponują go do zastosowania w terapii fotodynamicznej nowotworów. Wynik ten dodatkowo podnosi wartość pracy i daje nadzieję, że jesteśmy blisko uzyskania nowego, skutecznego leku.

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Moniki Jakubowskiej, z tak podjętą tematyką jak i sposobem prezentacji uzyskanych wyników i ich interpretacją spełnia wszelkie wymagania stawiane tego typu pracom.

Doktorantka pokazała, że posiada odpowiednią wiedzę i bardzo dobrze opanowany warsztat eksperymentalny, pozwalający na pełną charakterystykę związków o potencjalnym zastosowaniu w terapii PDT. Dlatego z pełnym przeświadczeniem stwierdzam, że rozprawa spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określone w art.13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r, nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję o dopuszczenie pani mgr Moniki Jakubowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o jej wyróżnienie, ze względu na profesjonalne przedstawienie metodyki badań *in vitro* i *in vivo*.

Alicja Ratuszna