

Recenzja pracy doktorskiej mgr Martyny Krzykawskiej-Serdy, zatytułowanej „Przeciwnowotworowa terapia fotodynamiczna z zastosowaniem pochodnej bakteriochloryny. Wybrane efekty komórkowe, naczyniowe i immunologiczne”

W tym roku mija 100 lat od opublikowania przez H. von Tappeinera i H. Jesionka pionierskiej pracy, w której opisali wykorzystanie efektów fotodynamicznych w leczeniu raka skóry i około 40 lat od zastosowania przez T. Dougherty tzw. pochodnej hematoporfiryny w fotodynamicznej terapii ponad stu nowotworów skóry. Pomimo tego, PDT ciągle nazywana jest nową, obiecującą metodą leczenia nowotworów i niektórych innych schorzeń. Wydaje się, że takie postrzeganie PDT wynika z pewnego rozczarowania terapią fotodynamiczną, która wbrew nieuzasadnionym zresztą oczekiwaniom nie sprawdziła się jako uniwersalna metoda leczenia raka, a z drugiej strony ze stałej nadziei na poprawienie skuteczności PDT poprzez znalezienie nowych efektywnych fotosensybilizatorów i optymalizację samej terapii. Rzeczywiście, imponujący jest postęp w syntezie fotosensybilizatorów nowej generacji o właściwościach fotofizycznych umożliwiających ich efektywne wzbudzenie promieniowaniem z bliskiej podczerwieni, prowadzące do wydajnej produkcji reaktywnych form tlenu. Znacznie trudniej uzyskać efekt wybiórczej akumulacji cząsteczek fotosensybilizatora w patologicznie zmienionej tkance, co jest istotne dla minimalizacji niepożądanego fototoksyczności. Oddzielną, niezwykle złożoną kwestią jest kontrola odpowiedzi biologicznej lezji poddanych terapii fotodynamicznej, sąsiadujących, zdrowych tkanek, jak również organizmu człowieka. Wypadkowe reakcje tkanki patologicznie zmienionej oraz całego organizmu poddanego miejscowej terapii fotodynamicznej, to efekt bardzo wielu procesów na poziomie molekularnym, komórkowym, tkankowym i ogólnoustrojowym, które bardzo trudno przewidzieć oraz dokładnie zanalizować. Jest to zapewne jednym z powodów dla których we wcześniejszych badaniach niejednokrotnie pomijano te ważne aspekty PDT. Nie ulega jednak wątpliwości, że bez szczegółowej analizy przynajmniej najważniejszych procesów biologicznych na różnych poziomach organizacji organizmu, jakie towarzyszą PDT, raczej nie można oczekiwać istotnego postępu w rozwoju tej interesującej formy terapii niektórych schorzeń, zwłaszcza nowotworów złośliwych.

Te właśnie zagadnienia stanowią temat recenzowanej pracy doktorskiej mgr Martyny Krzykawskiej-Serdy. Praca ta, zatytułowana „Przeciwnowotworowa terapia fotodynamiczna z zastosowaniem pochodnej bakteriochloryny. Wybrane efekty komórkowe, naczyniowe i immunologiczne”, wykonana została pod kierunkiem prof. dr hab. Krystyny Urbańskiej w Zakładzie Biofizyki WBBiB UJ, oraz pod kierunkiem prof. dr hab. Grażyny Stochel w Zespole Chemii Koordynacyjnej i Bionieorganicznej Wydziału Chemii UJ.

Rozprawa doktorska mgr Krzykawskiej-Serdy ma typową dla tego typu opracowań formę i składa się z wprowadzenia, celów pracy, materiałów i metod, wyników, dyskusji, wniosków i obszernej bibliografii. Dodatkowo, przed wprowadzeniem zamieszczono wykaz używanych skrótów, streszczenie po polsku i po angielsku oraz rodzaj abstraktu graficznego. Po bibliografii znajduje się jeszcze 12-stronicowy suplement. Natomiast nietypową dla rozpraw doktorskich jest rozmiar recenzowanej pracy, która zredagowana została na 242 stronach i zawiera 75 rysunków, fotografii i wykresów, oraz 26 tabel! Chociaż taka objętość rozprawy doktorskiej oraz ilość zamieszczonego w niej materiału faktograficznego może wydawać się nadmierna i na pewno nie ułatwia dokładnego zapoznania się z pracą, jest jednak uzasadniona uwzględniając niezwykle ambitny cel badań oraz uzyskane przez doktorantkę wyniki.

We wprowadzeniu mgr Krzykawska-Serda porusza kwestię braku w pełni skutecznych sposobów leczenia nowotworów, zwracając uwagę na główne strategie współczesnej terapii raka, w których specyficzność działania próbuje się uzyskać poprzez wykorzystanie mechanizmów biologicznych i właściwości fizykochemicznych nowotworu. Następnie doktorantka krótko omawia zasady terapii fotodynamicznej, charakteryzując właściwości fizykochemiczne i farmakologiczne „idealnego fotosensybilizatora”. Według doktorantki, użyta w badaniach pochodna bakteriochloryny – 5,10,14,10-tetrakis(2,6-difluoro-3-N-metylosulfonylofenylo)bakteriochloryna (F_2BMet), ma cechy kwalifikujące ją do takiego właśnie idealnego fotosensybilizatora. W dalszej części wprowadzenia doktorantka omawia wpływ efektu fotodynamicznego na komórki, w tym rolę nekrozy i apoptozy w śmierci komórek indukowanej działaniem fotodynamicznym. Analizuje ponadto efekty naczyniowe w PDT oraz reakcję układu immunologicznego na zabijanie komórek nowotworowych oraz przyżyciowych modyfikacji w wyniku PDT. Pomimo pewnej lakoniczności, ten fragment rozprawy doktorskiej świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym mgr Krzykawskiej-Serdy do podjęcia się tak trudnych i ambitnych zadań badawczych.

Celem pracy doktorskiej mgr Krzykawskiej-Serdy było określenie skuteczności terapii fotodynamicznej przy użyciu pochodnej bakteriochloryny F_2BMet oraz wykazanie, które efekty komórkowe, naczyniowe i immunologiczne determinują obserwowane skutki biologiczne zastosowanej PDT. Dla osiągnięcia zamierzonego celu doktorantka miała zrealizować 7 szczegółowych zadań badawczych, które polegały na: charakterystyce optycznej fotosensybilizatora w wybranych układach modelowych, określeniu kinetyki i stopnia wnikania fotosensybilizatora do komórek *in vitro* oraz do guza i zdrowych tkanek *in vivo*, ustaleniu „ciemnej” toksyczności fotosensybilizatora oraz jego aktywności fotodynamicznej *in vitro* i *in vivo*, analizie bezpośrednich skutków aktywności fotodynamicznej F_2Bmet w warunkach *in vitro*, charakterystyce zmian unaczynienia guzów nowotworowych po PDT oraz wykazaniu aktywacji układu immunologicznego w wyniku zastosowanego PDT.

Materiały i różne, uzupełniające się metody użyte w badaniach na komórkach *in vitro*, jak i zwierzętach doświadczalnych zostały opisane na 39 stronach pracy doktorskiej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że mgr Krzykawska-Serda porównała odpowiedź na działanie fotodynamiczne F₂BMet aż czterech linii komórek nowotworowych pochodzenia ludzkiego i mysiego oraz czterech kontrolnych linii komórek nienowotworowych. Efekty PDT u zwierząt doświadczalnych badane były na myszach szczepu DBA/2 i C57bl/6J. Do oceny fotodynamicznej efektywności użytego fotosensybilizatora doktorantka zastosowała klasyczne testy żywotności komórek *in vitro*, cytometrię przepływową, mikroskopię fluorescencyjną, pomiar ruchliwości przy pomocy testu rysy i analizy trajektorii pojedynczych komórek. W badaniach na zwierzętach doktorantka, oprócz konwencjonalnych metod oceny efektów PDT, stosowała zaawansowane metody fizyczne, takie jak tlenometria EPR *in vivo*, obrazowanie perfuzji przy pomocy laserowego układu dopplerowskiego i ultrasonografia. Oprócz tego, doktorantka zastosowała standardowe metody do oznaczania biodystrybucji i farmakokinetyki fotosensybilizatora, pomiaru cytokin i analizy histologicznej tkanek zwierząt kontrolnych oraz poddanych PDT.

Opis wyników uzyskanych przez mgr Krzykowską-Serdę zajmuje aż 79 stron. Rozdział ten zaczyna się od charakterystyki optycznej F₂BMet w wybranych rozpuszczalnikach organicznych oraz środowisku wodnym z dodatkiem solubilizujących cząsteczki fotosensybilizatora czynników, takich jak Triton X-100 lub bydlęca surowica płodowa. Z uwagi na to, że podstawowe właściwości fizykochemiczne F₂BMet zostały już wcześniej scharakteryzowane w niezależnych badaniach, dane te można traktować jako swego rodzaju weryfikację opublikowanych wyników w układach o właściwościach zbliżonych do niektórych właściwości badanych układów biologicznych. Pomiar akumulacji fotosensybilizatora w komórkach *in vitro* pokazał, że komórki nienowotworowe silniej akumulują F₂BMet w prównaniu z komórkami nowotworowymi. Doktorantka stwierdziła zróżnicowaną akumulację fotosensybilizatora w tkankach zwierząt doświadczalnych po jego dożylnym podaniu. O ile w krótkim czasie po podaniu F₂BMet znajdował się głównie w świetle naczyń krwionośnych guza, a maksimum jego fluorescencji w skórze obserwowano po 24 godzinach, to akumulacja fotosensybilizatora w guzie miała miejsce po około 70 godzinach. Pomimo, iż doktorantka przeprowadziła analizę matematyczną danych, dopasowując rejestrowaną w skórze fluorescencję F₂BMet do funkcji Gaussa, uzyskane dopasowanie nie wygląda zbyt przekonująco. Ważną właściwością badanego fotosensybilizatora jest brak toksyczności związku, jak również produktów jego fotodegradacji. F₂BMet wykazuje dużą aktywność fotodynamiczną, przy czym w warunkach *in vitro* silniejszą fototoksyczność związku obserwowano w przypadku komórek nienowotworowych. Skuteczność terapii fotodynamicznej F₂BMet badano na myszach obarczonych guzem S91/13 oraz guzem LLC.

Porównanie dwu protokołów PDT – terapii skierowanej przeciwko naczyniom krwionośnym guza (VTP) oraz skierowanej przeciwko komórkom guza (CTP), pozwoliło stwierdzić doktorantce, że obydwie procedury znacząco wydłużają przeżywalność zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej. Okazało się, że zarówno CTP jak i VTP indukują nekrozę guza nowotworowego, przy czym jej poziom jest wyższy w przypadku VTP. Chociaż uzyskane przez doktorantkę wyniki wyglądają wiarygodnie i na ogół są spójne ze sformułowanymi przez nią wnioskami, dopasowanie uzyskanych danych opisujących wzrost guza do eksponenty (rys. 4.2.2), nie we wszystkich przypadkach jest uzasadnione. Doktorantka powinna próbować przedstawić prawdopodobną przyczynę zaobserwowanych rozbieżności.

Mgr Krzykawska-Serda analizowała także odpowiedź komórkową na działanie fotodynamiczne przy udziale F_2BMet stwierdzając, że chociaż efekt fotodynamiczny w warunkach *in vitro* indukuje zarówno apoptozę jak i nekrozę, rodzaj śmierci komórek zależy od dawki światła i jego gęstości mocy. Ponadto komórki, które przeżyły efekt fotodynamiczny, wykazują przejściowo mniejszą zdolność do migracji oraz zredukowaną zdolność do tworzenia kolonii w organizmie myszy C57bl/6.

Wysoko oceniam wyniki doktorantki dotyczące badań nad wpływem PDT na unaczynienie i natlenowanie guza. Doktorantka mierzyła przy pomocy LDPI perfuzję powierzchniową łapy obciążonej guzem przed i po PDT. Stosując ultrasonografię dopplerowską monitorowała zmiany strukturalne i funkcjonalne naczyń w trakcie naświetlania guzów, a przy pomocy tlenometrii EPR z zastosowaniem sondy paramagnetycznej w postaci mikrokryształków LiPc mierzyła stężenie tlenu w guzie i kinetykę jego zmian w okresie kilku dni po PDT. Te interesujące i ważne badania, zrealizowane przy pomocy zaawansowanych metod fizycznych, zostały uzupełnione pomiarami poziomu mVEGF oraz poziomu antygenu charakterystycznego dla naczyń krwionośnych przy zastosowaniu standardowych metod biologii molekularnej. Do najważniejszych wyników z tego zakresu badań zaliczyć należy obserwację, iż VTP powoduje przejściowy spadek, a następnie wzrost perfuzji powierzchniowej guza, natomiast CTP towarzyszy długoterminowy wzrost mikrokrażenia krwi. Okazało się, że VTP powoduje ostre zablokowanie przepływu krwi w obrębie i w otoczeniu guza, które utrzymuje się w ciągu 48-72 godzin. Z drugiej strony, CTP wywołuje spadek przepływu krwi w naczyniach guza tuż po zakończeniu PDT, a następnie stopniowy wzrost, którego maksimum obserwuje się po 8 dniach.

W ostatniej części tego rozdziału, doktorantka omawia wyniki dotyczące wpływu PDT na układ immunologiczny zwierząt doświadczalnych. I tak, VTP towarzyszy znaczny wzrost infiltracji tkanki guza przez neutrofile oraz zmienny poziom infiltracji guzów traktowanych CTP. Zarówno VTP jak i CTP indukują znaczny naciek tkanki guza przez makrofagi. Z wielu analizowanych cytokin i chemokin, jedynie poziom TNF α konsekwentnie spadał po VTP, a po CTP dotyczy to IL-6 i IL10. Doktorantka

zaobserwowała stabilizację/zmniejszenie objętości kontrolnych guzów nietraktowanych PDT w organizmie zwierząt, u których guzy kontrlateralne poddane były VTP lub CTP.

Dyskusja wyników zawarta jest na 41 stronach recenzowanej rozprawy doktorskiej. Nie znalazłem w przedstawionej przez doktorantkę argumentacji wyraźnych niespójności, czy nieuzasadnionych spekulacji. Można się więc zgodzić z zaproponowaną interpretacją omawianych w rozprawie wyników. Doktorantka zwraca uwagę na korzystną z punktu widzenia PDT biodystrybucję F_2BMet w tkankach myszy po dożylnym podaniu fotosensybilizatora. Zróżnicowana akumulacja fotosensybilizatora w świetle naczyń krwionośnych guza lub w guzie nowotworu, po różnym czasie od podania F_2BMet , umożliwia wybór konkretnej formy PDT, tj VTP lub CTP, co powinno przyczynić się do optymalizacji terapii fotodynamicznej różnych nowotworów. W podsumowaniu tej części dyskusji mgr Krzykawska-Serda konkluduje, iż akumulacja fotosensybilizatora w guzie nowotworowym zależy od właściwości amfifilowych barwnika, obecności w komórkach nowotworowych transporterów związanych z usuwaniem leków, heterogenej struktury perfuzji nowotworu, wypłukiwania fotosensybilizatora z tkanki guza, gęstości komórek guza oraz obecności obszarów nekrotycznych guza.

„Idealny fotosensybilizator” powinien być nietoksyczny w ciemności i charakteryzować się brakiem tzw. niecelowych uszkodzeń fotodynamicznych. Ponadto pożądana jest nietoksyczność produktów jego rozpadu. Z dyskusji uzyskanych wyników można wnioskować, iż F_2BMet w znacznej części spełnia te warunki. Z drugiej strony, przynajmniej *in vitro*, komórki nowotworowe wykazują mniejszą wrażliwość na stres fotodynamiczny indukowany F_2BMet aniżeli komórki nienowotworowe, przy czym najbardziej opornymi okazały się komórki B16F10. Doktorantka przekonująco uzasadnia małą wrażliwość tych komórek na stres fotodynamiczny znaczną zawartością melaniny, która działa jak filtr optyczny i przeciwutleniacz.

Ważną cechą badanego fotosensybilizatora, która może determinować skuteczność PDT, jest niezależność efektywności fotodynamicznej od gęstości mocy promieniowania, stwierdzoną w warunkach *in vivo* dla tych samych dawek światła. Doktorantka szczegółowo przedyskutowała obserwowane różnice w skuteczności niszczenia nowotworu po zastosowaniu VTP i CTP, zwracając uwagę na szereg czynników, które mogą modyfikować wypadkową odpowiedź guza na stres fotodynamiczny.

Analizując wyniki terapii fotodynamicznej skierowanej przeciwko naczyniom nowotworu, doktorantka stwierdza, iż efekt naczyniowy jest krytycznym czynnikiem skuteczności terapii przeciwnowotworowej. Ma to związek z indukcją silnej hipoksji tkanki guza, która może prowadzić do krytycznego ograniczenia dostępu składników odżywczych i tlenu do żywych komórek nowotworu. Hipoksja nowotworu może również indukować

normalizację naczyń krwionośnych, co możnaby wykorzystać do lepszej dystrybucji leków przeciwnowotworowych. Z drugiej strony pojawia się ryzyko wznowy guza w wyniku wtórnej angiogenezy.

Według doktorantki „idealna terapia przeciwnowotworowa” powinna również stymulować siły obronne organizmu do efektywnego zwalczania komórek nowotworu. Uzyskane przez nią wyniki zdają się potwierdzać taką możliwość ponieważ po PDT z zastosowaniem F₂BMet obserwuje się zahamowanie wzrostu kontrlateralnych nietraktowanych guzów. Wskazuje to na aktywację specyficznej odpowiedzi immunologicznej zwierząt poddanych PDT.

Dyskusję kończy półstronicowy tekst nazwany „Perspektywami”, w którym doktorantka konkluduje, iż możliwa jest optymalizacja leczenia nowotworów poprzez odpowiednie monitorowanie przebiegu i natężenia efektów komórkowych, naczyniowych i immunologicznych towarzyszących PDT.

We wnioskach zawarta jest odpowiedź na pytanie, czy i w jakim stopniu wykonano konkretne zadania badawcze. Wynika z niej, że doktorantka pomyślnie zrealizowała wszystkie zamierzone cele swych badań. Najważniejszym ogólnym wnioskiem, jaki formułuje doktorantka, jest stwierdzenie, iż PDT przy udziale F₂BMet i promieniowania z bliskiej podczerwieni, jest skuteczną metodą niszczenia nowotworów doświadczalnych u myszy.

Jestem przekonany, że doktorantka włożyła wiele starań aby zreagować możliwie jak najlepszą rozprawę. Nie uszczęgła się jednak wielu błędów topograficznych, z których najczęstsze to nierozdzielone wyrazy. W zamieszczonej na okładce erracie wymienia się znaczną część tych błędów. W kilku przypadkach mogą razić nieporadne lub nieprecyzyjne sformułowania znajdujące się w tekście. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę przynajmniej na niektóre zauważone usterki pracy.

Wykaz skrótów: GSH zwykle oznacza zredukowany glutation a nie „peroksydazę glutationową”

str 28, Tabela 2.1.: ALA nie absorbuje przy 635 nm, nie jest nawet fotosensybilizatorem, jedynie jego prekursorem

str 32: „...w kontekście PDT jest możliwe przekazanie ładunku (typ I)...”, raczej powinno być „w procesach towarzyszących PDT możliwy jest transfer elektronu (wodoru) (typ I)..”

str 33: z wymienionych ROS, jedynie rodnik hydroksylowy charakteryzuje się wysokim (nawet bardzo wysokim) potencjałem redoks, natomiast anionrodnik ponadtlenkowy jest raczej słabym reduktorem.

str 34, rys. 2.4: zaznaczone na rysunku okno fototerapeutyczne jest chyba zbyt przesunięte w stronę fal długich

str 35: antyoksydanty raczej zmiatają lub neutralizują wolne rodniki a nie „wygaszają”

str 39: dość niezręczne sformułowanie: „Ten rodzaj śmierci komórkowej umożliwia także przetrwanie komórkom...”

str 41: chyba powinno być: sieć naczyń krwionośnych nowotworu zamiast „sieć naczyń nowotworowych”

str 47: zamiast „promieniowanie magnetyczne” powinno być promieniowanie elektromagnetyczne

str 58: dość niezręczne sformułowanie -- „nieprzeżywalna metoda oznaczania przeżywalności komórek”

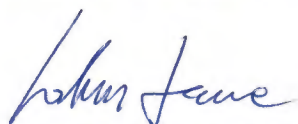
str 88, Tabela: brakuje jednostek w kolumnie „czasy życia trypletu”

str 141: „...zahamowanie mikrokrążenia **na czas...**”

str 169: Problematyka ta jest dobrze scharakteryzowana **przez zmiany** molowego współczynnika absorpcji”

str 172: „Proces wnikania fotosensybilizatora do komórek nowotworowych może być zatem **powiązany z problematyką transporterów...**”

Te nieścisłości i błędy, zresztą głównie stylistyczne, nie wpływają na moją jednoznacznie pozytywną i wysoką ocenę przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej, którą uważam za bardzo dobrą. Stwierdzam więc, że rozprawa doktorska mgr Martyny Krzykawskiej-Serdy spełnia zwyczajowe standardy prac doktorskich z biofizyki oraz wymogi art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 i dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Krzykawskiej-Serdy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie jej pracy stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Tadeusz Sarna

Kraków, 6 września 2013