



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Lekarski

Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej

Dr hab. Jolanta Saczko

Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej

Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Jakubowskiej

**pt.: „Feoforbid cynkowy jako fotouczulacz w terapii fotodynamicznej ludzkiego
gruczolakoraka (Adenocarcinoma) w modelu *in vitro* oraz *in vivo*”**

Pomimo postępu medycyny choroby nowotworowe nadal powodują wysoką śmiertelność u ludzi szczególnie w krajach rozwiniętych. Do roku 2020 w wymiarze globalnym dojdzie do podwojenia liczby zachorowań na choroby nowotworowe (z 10 do 20 milionów oraz do około 70% wzrostu zgonów z powodu nowotworów i ich powikłań). Te dane najlepiej obrazują skalę narastającego problemu oraz wskazują na potrzebę opracowania skutecznego i nowoczesnego leczenia. Dzięki postępowi w nauce, rośnie liczba wykrywanych przypadków nowotworów, co oczywiście nie ma przełożenia na przeżycie pacjentów, ponieważ stosowane standardowe metody leczenia są mało skuteczne i inwazyjne. Gruczolakoraki są obecnie jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów pochodzenia nabłonkowego. Należą do nowotworów złośliwych o dużym stopniu inwazyjności wykrywane w późnym stadium zaawansowania. Najczęściej obecnie spotykane guzy nowotworowe o tym typie histologicznym wykrywa się u pacjentów w jelicie grubym, płucach, gruczole sutkowym, żołądku i trzustce. Niepomyślne rokowanie w przypadku gruczolakoraków, ale także innych nowotworów stanowi poważne wyzwanie dla współczesnej onkologii. Ta sytuacja zmusza z jednej strony do wzmożonych działań prewencyjnych i profilaktycznych, a z drugiej strony do ciągłych poszukiwań nowych, doskonalszych i skuteczniejszych metod terapeutycznych. W tym aktualnym i ważnym nurcie prac naukowych

osadzona jest rozprawa doktorska mgr Moniki Jakubowskiej. Dotyczy ona oceny skuteczności działania jednej z bardzo obiecujących metod walki z nowotworami, jaką jest terapia fotodynamiczna (PDT). Chociaż podstawy tej metody są już znane od dawna, jednak w porównaniu z innymi metodami jest ona ciągle rzadko jeszcze stosowana i należne jej miejsce w diagnostyce i leczeniu chorób nowotworowych znajduje sobie z dużym trudem. Wynika to zarówno z pewnych ograniczeń metody (poszukiwania najbardziej efektywnych i najmniej inwazyjnych fotouczulaczy) jak i zbyt małej wiedzy dotyczącej molekularnych efektów PDT i możliwości ich modyfikacji. Podjęcie zatem przez doktorantkę trudu wniesienia nowych wyników badań w celu pełniejszego zrozumienia efektów PDT w połączeniu ze zmodyfikowanymi związkami pochodzenia naturalnego należy uznać za jak najbardziej zasadne.

Moje zastrzeżenie budzi jednak tytuł rozprawy. Moim zdaniem należałoby napisać: "Feoforbid cynkowy jako fotouczulacz w terapii fotodynamicznej ludzkich gruczolakoraków w modelu *in vitro* i *in vivo*". Sądzę, że to tylko drobne niedopatrzenie.

Rozprawa doktorska ma klasyczny układ. W krótkim **Wstępie** Doktorantka przedstawia charakterystykę gruczolakoraków ich budowę, miejsce pierwotnych i wtórnych zmian lokalizacji tego typu nowotworów oraz metody leczenia. Moim zdaniem jest to opis niepełny i wymagałby uzupełnienia. Przykładowo wyróżniamy jeszcze wiele typów gruczolakoraków ludzkich. Sposobów leczenia też jest dużo więcej. Podejrzewam, że pobieżne potraktowanie rozdziału dotyczącego gruczolakoraków można usprawiedliwić tym, że mgr Monika Jakubowska nie jest lekarzem, ale sądzę, że nie zwalnia ją to do końca do bardziej uporządkowanego i dokładnego objaśnienia tego zagadnienia. We Wstępie Doktorantka przedstawia krótki rys historyczny i podstawy terapii fotodynamicznej oraz jej biologiczne mechanizmy. Opisuje fotouczulacze porfiryne ze szczególnym uwzględnieniem chlorofili i bakteriochlorofili w terapii fotodynamicznej. Opisuje także mechanizmy ochronne przed działaniem fitotoksycznym tych związków. Doktorantka napisała, cytując: „Za usuwanie feoforbidu odpowiada białko BCRP należące do rodziny transporterów ABC. Feoforbid palladowy po podaniu do ustroju pozostaje w naczyniach krwionośnych, a następnie już po kilkudziesięciu minutach od iniekcji jest usuwany z organizmu.” Zastanawia mnie, czy w tak krótkim okresie jego działanie fotodynamiczne jest skuteczne? Czy nie należałoby jednak zastosować modulatorów białka BCRP, żeby jednak przedłużyć jego pozostanie w naczyniach i uzyskać lepsze efekty terapii? Mgr Monika Jakubowska charakteryzuje także wybrany model myszy do realizacji postawionego sobie głównego celu pracy myszy nude z recesywną mutacją nude (nu/nu). Mutacja ta prowadzi do utraty funkcji czynnika transkrypcyjnego Foxn-1 biorącego udział w procesach keratynizacji oraz rozwoju embrionalnym grasicy. Uważam, że ten model badawczy został wybrany w sposób przemyślany i prawidłowy. Dodatkowo model guza nowotworowego

rosnącego u myszy bezgranicznej stanowi cenne narzędzie badawcze. Doktorantka jednak bardzo słusznie podkreśla, że nie można do tego modelu podchodzić zupełnie bezkrytycznie opisując rolę układu odpornościowego w rozwoju choroby nowotworowej. Podaje także inne ciekawe modele badawcze. W dalszej części wstępu Doktorantka omawia reaktywne formy azotu, szczególnie tlenek azotu, jego syntezę, budowę i rolę, jaką pełni w organizmie. Krótko opisuje także jego rolę w terapii fotodynamicznej. Sugerowałabym ostrożność w wyrażaniu poglądu, że NO tylko korzystnie wpływa na działanie przeciwnowotworowe. Tlenek azotu odgrywa ważną, ale dualistyczną rolę w komórkach nowotworowych poddanych reakcji fotodynamicznej. Zostało to opisane w licznych publikacjach, przykładowo podaję cztery Korbelik M, Parkins CS, Shibuya H, et al. Nitric oxide production by tumour tissue. Impact on the response to photodynamictherapy. Brit J Cancer 2000; 82: 1835–943. Zhou J, Brune B. NO and transcriptional regulation from signalling to death. Toxicology 2005; 208: 223–33. Ramiro DA, Bruno JM, Arselio PC, et al. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. BiochimBiophysActa 2004; 1704: 59–86. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol 1996; 271: 1424–37.

Cel pracy sprecyzowano jasno i konkretnie. Głównym celem rozprawy doktorskiej przedstawionej mi do recenzji była ocena efektywności terapii fotodynamicznej z użyciem feoforbidu cynkowego jako fotouczulacza wobec ludzkich guzów gruczolakoraka (należałoby jednak określić jakiego pochodzenia np. płuc) rosnącego u myszy BALB/Ca nude. Realizację tego celu poprzedziły zadania badawcze *in vitro* na ludzkich liniach gruczolakoraka gruczołu sutkowego (MCF-7) płuc (A549) i jelita grubego (LoVo) oraz badania *in vivo*.

Material i Metody opisane są w sposób staranny i szczegółowo. Chciałam jednak z racji recenzenta zwrócić uwagę na pewne nieścisłości. W rozdziale 1.4 Źródła światła. Eksperymenty *in vitro* należałoby podać także dawkę światła w J/cm² podobnie jak w części rozdziału Eksperymenty *in vivo*. Nie uważam tego za błąd tylko jedynie za przeoczenie. W rozdziale 2. Metody A Badania *in vitro* Test klonogeny może warto byłoby dokładniej określić, że przeżywalność komórek wyrażano, jako procent liczby kolonii uzyskanej na szalce kontrolnej (komórki nie poddane terapii). Czy określano wydajność proliferacyjną komórek, a także frakcję przeżyciową komórek dla poszczególnych badanych prób? Jeżeli tak to należałoby podać wzór, w jaki sposób było to obliczane. Zbyt odważne wydaje mi się stwierdzenie na podstawie obrazu morfologicznego z prostego mikroskopu świetlnego, że komórki poddane łącznemu działaniu fotouczulacza i światła wykazywały znaczne uszkodzenia błony komórkowej, co prowadziło do rozpadu komórek w trakcie odrywania od podłoża za pomocą trypsyny (Wyniki, rys. 12). Zmiany w obrębie błony można

obserwować na poziomie mikroskopu elektronowego, na poziomie prostego mikroskopu świetlnego można jedynie obserwować zmiany w morfologii komórek. Należy podkreślić, że metodyka badań prowadzonych *in vivo* została opisana bardzo starannie, w sposób bardzo zrozumiały i przemyślany. Zarówno materiał, jak i zastosowane metody badawcze, opisane w pracy przez Doktorantkę, zostały dobrane adekwatnie do postawionego sobie celu badań.

Wyniki przedstawione są w sposób czytelny, opisowo i odpowiednio udokumentowane w formie wykresów tabel i fotografii oraz dokładnie omówione z uwzględnieniem istotności statystycznej. Wyniki pracy są nowatorskie i bardzo interesujące. Na podstawie analizy emisji fluorescencji acetonowych ekstraktów przygotowanych z komórek mgr Monika Jakubowska oszacowała wewnątrzkomórkową zawartość feoforbidu cynkowego. Stwierdza na podstawie wykonanych badań, że widoczny jest wzrost zawartości Zn-Pheide (0,2 i 0,5 μM). Wykazuje zróżnicowaną zawartość feoforbidu cynkowego po 24h inkubacji, która jest niższa dla komórek LoVo, natomiast w komórkach A549 i MCF-7 jest zbliżona do uzyskanej dla czasu inkubacji 12h. Doktorantka wykazała także wewnątrzkomórkową kolokalizację badanego związku z systemami wewnątrzkomórkowych błon i pęcherzyków. Chciałabym zasugerować w tym miejscu, że taka lokalizacja może aktywować apoptozę komórek indukowaną stresem oksydacyjnym związaną z retikulum endoplazmatycznym. Warto byłoby zatem w przyszłości prześledzić ten szlak apoptotyczny, w którym kaspaza 12 jest kaspazą inicjatorową. Określono również, że Zn-Pheide w badanym zakresie stężeń nie wpływa w sposób istotny na przeżywalność komórek A549 i LoVo w porównaniu z komórkami MCF-7. Doktorantka wykazała również, że feoforbid cynkowy powoduje zależny od stężenia spadek przeżywalności wszystkich fotouczulanych komórek. Wykazała także, że komórki A549 wykazują największą wrażliwość na światło. Słusznie zatem wybrała właśnie te komórki do dalszych eksperymentów (rodzaje śmierci komórkowej w populacji komórek A549, wpływ światła na rodzaje śmierci komórkowej w populacji komórek A549, wpływ feoforbidu cynkowego na rodzaje śmierci komórkowej w populacji komórek A549). Dokonała także porównawczej oceny różnych fotouczulaczy (chloride i Photofrinu w porównaniu z feoforbiden cynkowym) na rodzaje śmierci komórkowej. Najlepszy efekt fotodynamiczny uzyskano dla feoforbidu cynkowego. Na wyróżnienie zasługuje część wyników dotycząca badań *in vivo*, która przedstawiono została w postaci precyzyjnie opisanych protokołów. Fotouczulacz podawano dootrzewnowo i dożylnie. W badaniach *in vivo* podobnie jak *in vitro* wykazano silny efekt terapeutyczny feoforbidu cynkowego. Związek ten podawany dootrzewnowo w dawce 1,5 mg/kg i 1-2mg/kg dożylnie prowadził do całkowitej regresji lub istotne spowolnienie tempa wzrostu guzów po naświetlaniu światłem czerwonym w dawce 120 J/cm². Na szczególną uwagę zasługuje wynik uzyskany w widmach EPR, w których zaobserwowano sygnały nitrozyłhemoglobiny oraz tlenku

azotu po raz pierwszy dla guzów ludzkich rosnących w ciele myszy bezgranicznych, czyli w przeszczepie międzygatunkowym.

W **Dyskusji** przedstawiono kolejno wyniki uzyskane w poszczególnych metodach oraz omówiono je i porównano z odpowiednimi wynikami innych autorów. Za nowatorskie i bardzo ułatwiające pracę recenzentowi uważam podział dyskusji na podrozdziały zgodne z podrozdziałami wyników.

W zakończeniu pracy Doktorantka przedstawia jeden główny **Wniosek** sformułowany na podstawie wniosków szczegółowych wyprowadzonych na podstawie badań *in vitro* i *in vivo*.

Cytowane piśmiennictwo obejmuje 150 pozycji; w znakomitej większości są to oryginalne prace anglojęzyczne. Na wyróżnienie zasługuje fakt, że część wyników tej pracy zostało opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej i w postaci komunikatów zjazdowych.

Moja ogólna ocena pracy jest bardzo dobra. Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi nie rzutują na moją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej mgr Moniki Jakubowskiej, którą uważam za oryginalne osiągnięcie naukowe Doktorantki i Jej Promotora.

Uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Jakubowskiej świadczy o jej dojrzałości naukowej, jest wyrazem przemyślanej koncepcji, staranności wykonania i planowania badań oraz ich logicznej interpretacji. Rozprawa spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez art. 14 i 15 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Moniki Jakubowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sądzę ponadto, że ze względu na nakład pracy, stosowanie bogatego warsztatu badawczego oraz uzyskane oryginalne i nowatorskie wyniki rozprawa ta zasługuje na wyróżnienie.

Wrocław 07 czerwca 2013

dr hab. Jolanta Saczko

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
BIOCHEMII I LECZNIKA
LEKARSKIEJ
punkt
dr hab. Jolanta Saczko