



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

AUTOREFERAT

mgr Barbara Pucelik

„Molekularne mechanizmy aktywności biologicznej modyfikowanych bakteriochloryn jako fotosensybilizatorów w terapii fotodynamicznej (PDT)”

Promotor: Prof. dr hab. Grażyna Stochel

Promotor pomocniczy: Dr Janusz M. Dąbrowski

Zespół Fizykochemii koordynacyjnej i Bionieorganicznej, Zakład Chemii Nieorganicznej,
Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Recenzenci:

Dr hab. inż. Julita Kulbacka

Wydział Lekarski Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Dr hab. Robert Musiol

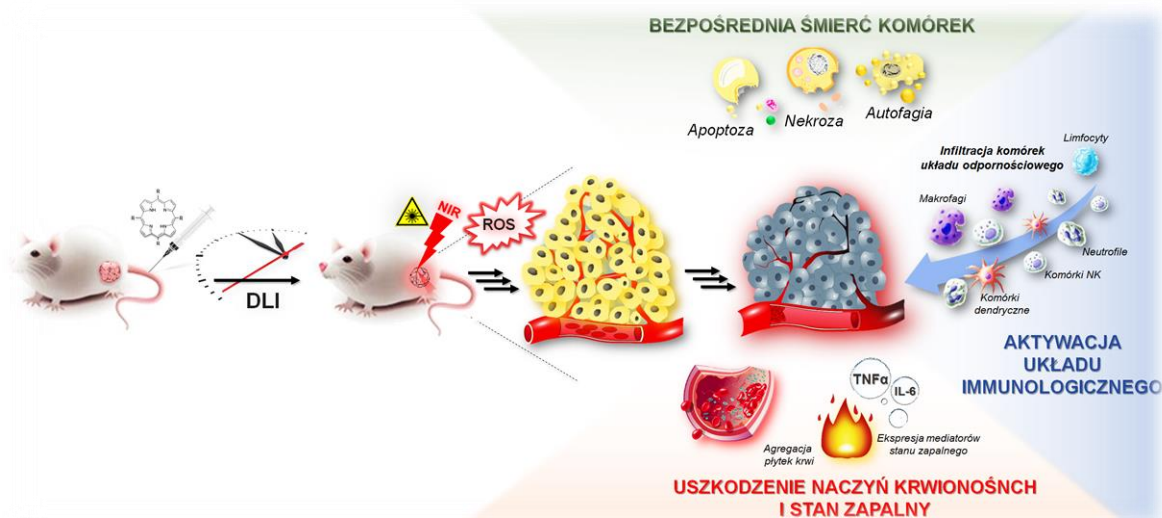
Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Uniwersytet Śląski w Katowicach

Rozprawa doktorska została wykonana w ramach współpracy z Uniwersytetem w Coimbrze (Portugalia) oraz realizacji projektów badawczych: Grantów Narodowego Centrum Nauki (NCN) nr 2013/11/D/ST5/02995 i 2016/22/E/NZ7/00420 oraz Grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) nr IP2014008573

Kraków, 2018

1. Wprowadzenie

Terapia fotodynamiczna (PDT) jest obecnie terapią komplementarną w stosunku do tradycyjnych metod leczenia nowotworów. Strategia ta wymaga trzech podstawowych elementów osobno nietoksycznych: fotosensybilizatora (PS), tlenu cząsteczkowego oraz promieniowania elektromagnetycznego o odpowiedniej mocy i długości fali dopasowanej do pasm absorpcji fotosensybilizatora. Efekt fotodynamiczny polega na wprowadzeniu do organizmu substancji aktywnej fotochemicznie - fotosensybilizatora, która po wzbudzeniu promieniowaniem elektromagnetycznym powoduje, że w tkance zachodzą dwa główne typy reakcji fotochemicznych, w wyniku których generowane są reaktywne formy tlenu (ROS). ROS prowadzą do stresu oksydacyjnego w obrębie guza, determinując tym samym przeciwnowotworową aktywność PDT, na którą składają się trzy powiązane mechanizmy: (1) bezpośredni efekt cytotoksyczny - śmierć komórek nowotworowych na drodze apoptozy, nekrozy i/lub autofagii, (2) efekt pośredni polegający na zamykaniu okółoguzowych naczyń krwionośnych oraz (3) działanie wtórne, czyli stymulacja układu odpornościowego do lokalnej i systemowej odpowiedzi immunologicznej oraz indukowanie procesów prozapalnych, Rys 1.



Rysunek 1. Schemat przedstawiający etapy terapii fotodynamicznej oraz mechanizmy jej aktywności przeciwnowotworowej.

Modyfikowane chemicznie bakteriochloryny wydają się być niemal idealnymi kandydatami zarówno do klasycznej terapii fotodynamicznej jak i eksperymentalnej terapii ukierunkowanej. Z uwagi na fakt, że odpowiedź układu odpornościowego jest czynnikiem determinującym skuteczność terapii i wyleczenie całego organizmu, największą rolę przypisuje się aspektom immunologicznym PDT. Terapia fotodynamiczna poprzez modyfikację odpowiedzi immunologicznej oraz tzw. fotoimmunoterapia jest nową eksperymentalną strategią przeciwnowotworową. Efekt fotoimmunoterapeutyczny, leżący u jej podstaw, polega przede wszystkim na uzyskaniu całkowitej selektywności wobec tkanek nowotworowych i jednoczesnym stymulowaniu układu odpornościowego organizmu. Działanie to możliwe jest poprzez

zaprojektowanie ukierunkowanego fotosensybilizatora, który rozpoznaje specyficzne białka na powierzchni komórek zmienionych chorobowo lub mikrośrodowisko nowotworowe.

Inteligentne modyfikacje oraz funkcjonalizacja nowych fotosensybilizatorów pozwalają zatem uzyskać efekt zwiększonej selektywności wobec komórek nowotworowych, wynikającej z lepszej akumulacji w komórkach nowotworowych bądź mikrośrodowisku (np. nowotworowe naczynia krwionośne, komórki śródbłonna), a także z lokalnego naświetlania promieniowaniem laserowym z zachowaniem minimalnego marginesu tkanki zdrowej. Opisane dotychczas w literaturze spektakularne wyniki leczenia niektórych typów nowotworów przy zastosowaniu ukierunkowanej terapii fotodynamicznej sprawiają, że jest to jedna z najbardziej obiecujących metod leczenia nowotworów, jakie pojawiły się w onkologii w ciągu ostatnich lat. Należy jednak zaznaczyć, że jest to nowa i eksperymentalna strategia przeciwnowotworowa, kluczowe jest zatem poznanie zarówno istotnych czynników chemicznych i biologicznych, jak również molekularnych mechanizmów działania determinujących jej niską inwazyjność, selektywność oraz wysoki indeks terapeutyczny.

2. Podejmowane problemy badawcze oraz najważniejsze wyniki badań

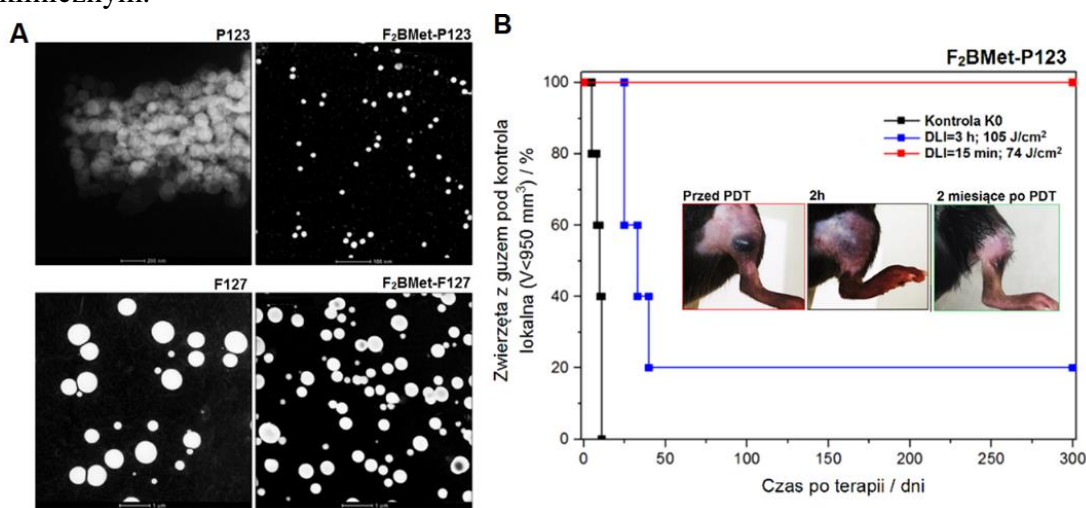
2.1. *Zależność struktura-aktywność biologiczna (SAR) modyfikowanych bakteriochloryn*

W porównaniu z poznaną złożonością chorób nowotworowych, czynniki molekularne organizmu gospodarza, które determinują odpowiedź na stosowane schematy PDT wciąż nie są do końca poznane. W związku z tym, niniejsza praca doktorska wpisuje się w nurt badań prowadzących do uzyskania informacji dotyczących mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za przeciwnowotworową aktywność terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem syntetycznych modyfikowanych bakteriochloryn jako fotosensybilizatorów.

Głównym celem pracy było sprawdzenie różnych ścieżek modyfikacji i funkcjonalizacji fotosensybilizatorów pozwalające określić zależności pomiędzy ich strukturą, właściwościami fizykochemicznymi oraz fotochemicznymi a obserwowaną aktywnością biologiczną w układach *in vitro* i *in vivo*. Na podstawie uzyskanych w pracy wyników oraz w ramach wcześniejszych badań prowadzonych we współpracy z Uniwersytetem w Coimbrze (Portugalia), dokonano analizy zależności pomiędzy strukturą i właściwościami fizykochemicznymi wybranych bakteriochloryn a ich aktywnością biologiczną *in vitro* i skutecznością *in vivo*. W przeprowadzonych w pracy badaniach nad odpowiedzią immunologiczną obserwowaną po PDT dokonano analizy stanu zapalnego indukowanego PDT oraz charakterystykę mechanizmów molekularnych pod kątem ekspresji wybranych czynników immunologicznych i mediatorów stanu zapalnego prowadzących do generowania długoterminowej, przeciwnowotworowej odpowiedzi układu odpornościowego. Wykazano także różnice w skuteczności wybranych protokołów fototerapeutycznych (V-PDT, E-PDT, C-PDT) ze wskazaniem optymalnych warunków przeprowadzenia PDT (*vide* formuła PS, DLI, dawka promieniowania) oraz określeniem molekularnych biomarkerów skutecznej terapii fotodynamicznej.

Przeprowadzone badania nad zrozumieniem mechanizmów odpowiedzialnych za efektywność PDT obejmowały również tematykę selektywnego i kontrolowanego dostarczenia

fotosensybilizatorów. W przedstawianej pracy zaproponowana i opracowana została nowa formuła hydrofobowych i amfifilowych bakteriochloryn ($\log P \geq 1.9$) - oparta na kopolimerach blokowych z grupy Pluronic. W pracy wykazano, że enkapsulacja pochodnych bakteriochloryn micelach polimerowych o średnicy ok. 25 nm pozwala nie tylko na poprawę ich parametrów farmakokinetycznych oraz biodostępności, ale również na uzyskanie większej selektywności wobec naczyń nowotworowych oraz mikrośrodowiska okolicy guza dzięki efektowi zwiększonej przepuszczalności naczyniowej i zatrzymywania małych i dużych cząstek w tkance guza nowotworowego (ang. *enhanced vascular permeability and retention – EPR effect*). Efekt ten wykorzystano m.in. w celu zwiększenia skuteczności PDT wobec nowotworów bardziej inwazyjnych o zwiększonej oporności na tradycyjnie stosowane schematy leczenia (czerniak złośliwy o wysokim stopniu upigmentowania). Dowiedziano, że zastosowanie nowej, wrażliwej na zmiany pH środowiska formuła Redaporfinu ($F_2B\text{Met}$) w postaci miceli polimerowych opartych na poloksamerach Pluronic pozwala na znaczne zwiększenie efektywności V-PDT prowadzącej do 100%, długoterminowej wyleczalności czerniaka upigmentowanego w modelu przedklinicznym.



Rysunek 2. (A) Obrazy mikroskopowe STEM otrzymane dla P123 i F127 odpowiednio przed i po enkapsulacji $F_2B\text{Met}$; (B) Analiza skuteczności terapeutycznej V-PDT skierowanej wobec mysiego czerniaka złośliwego o wysokim stopniu upigmentowania z zastosowaniem enkapsulowanego w nanomicelach polimerowych fotosensybilizatora ($F_2B\text{Met-P123}$).

Na podstawie przedstawionych w rozprawie wyników można wnioskować, że fotosensybilizatorami najbardziej skutecznym w V-PDT (DLI=15 min) są związki o hydrofilowym bądź amfifilowym charakterze, tj. sulfonowe i wybrane sulfonamidowe pochodne bakteriochloryn (F_2BOH , $\log P = -1.4$; $F_2B\text{Met}$ $\log P = 1.9$). W protokołach charakteryzujących się dłuższym czasem pomiędzy dożylnym podaniem leku a naświetlaniem guza (DLI) wynoszącym 3-72 h, ukierunkowanych przede wszystkim na komórki nowotworowe dużo skuteczniejsze okazały się fotosensybilizatory o charakterze lipofilowym ($F_2B\text{Prc}$, $\log P = 3.2$; $Cl_2B\text{Hep}$, $\log P = 4.2$). Związki te, z uwagi na ograniczoną rozpuszczalność w środowisku wodnym, poddano dodatkowo enkapsulacji w micelach polimerowych opartych na poloksamerach Pluronic, które

pozwołyły zwiększyć ich efektywność i selektywność na skutek: (1) znacznego zwiększenia rozpuszczalności; (2) obniżenia tendencji do agregacji w środowisku biologicznym; (3) poprawę stabilności oraz zmniejszenie podatności na fotodegradację, (4) zwiększenie wydajności generowania ROS z zaznaczeniem tworzenia się form wolnorodnikowych.

2.2. *Mechanizmy molekularne będące podstawą generowania odpowiedzi immunologicznej po PDT*

W pracy przedstawiono analizę panelu czynników immunologicznych oraz mediatorów towarzyszących lokalnej i systemowej reakcji zapalnej indukowanej działaniem fotodynamicznym. Obserwowany po PDT kontrolowany stan zapalny prowadzi do aktywacji mechanizmów odpowiedzi immunologicznej m.in. poprzez wzmożoną ekspresję cytokin prozapalnych oraz czynników odpowiedzialnych za generowanie długoterminowej odpowiedzi swoistej. Na podstawie uzyskanych wyników zweryfikowano hipotezę, że przeprowadzona terapia fotodynamiczna z zastosowaniem modyfikowanych bakteriochloryn prowadzi nie tylko do zniszczenia guza pierwotnego, ale również stymulacji układu odpornościowego, dzięki której możliwe jest (1) rozpoznanie oraz zniszczenie pozostałych komórek nowotworowych zarówno w obszarze mikrośrodowiska, jak i będących w stadium rozsianym (z odległymi przerzutami), (2) uzyskanie przeciwnowotworowego efektu abskopalnego *in vivo* (3) odrzucenie ponownego przeszczepu tych samych komórek nowotworowych zarówno w przypadku guza pierwotnego, jak również w modelu przerzutów do płuc.

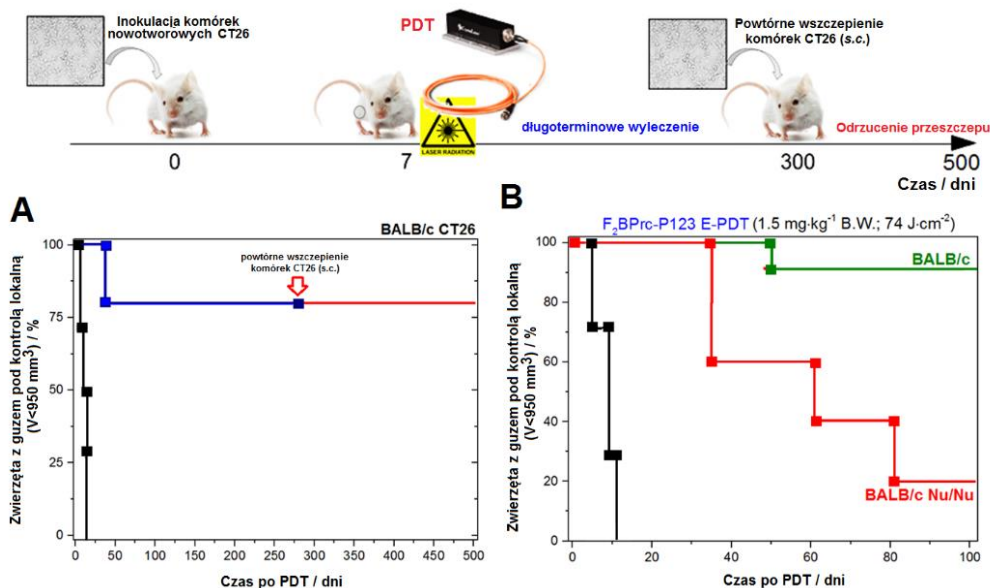
Wykazano także różnice w skuteczności wybranych protokołów fototerapeutycznych (V-PDT, E-PDT, C-PDT) ze wskazaniem optymalnych warunków przeprowadzenia PDT (*vide* formuła PS, DLI, dawka promieniowania) oraz określeniem molekularnych biomarkerów skutecznej terapii fotodynamicznej. Na podstawie przeprowadzonych analiz molekularnych można m.in. wnioskować, że V-PDT prowadzi do zwiększenia aktywności: IL-6, KC, MIG oraz MIP1 β , które zaangażowane są w dużej mierze w mechanizmy wzmocnienia funkcji limfocytów T i B, silną reakcją zapalną modulowaną przez podstawową populację neutrofilów oraz aktywację granulocytów. Z kolei, E-PDT indukuje zwiększoną ekspresję MIP-2, IP-10, MCP-1, TNF α i GM-CSF. Czynniki te wskazują na początkową aktywację neutrofilów, która w czasie trwania procesu zapalnego zastępowana jest rekrutacją monocytów. Ponadto, czynnikiem unikatowym, którego sekrecję wykazano wyłącznie po tym wariantcie terapii jest GM-CSF, którego funkcje polegają m.in. na zwiększeniu ilości neutrofilów (indukowanych) oraz promowaniu mechanizmów prowadzących do wytworzenia swoistej odpowiedzi układu odpornościowego, Rys. 3.



Rysunek 3. Rola poszczególnych cytokin w aktywacji mechanizmów odpowiedzi immunologicznej powstającej po V-PDT oraz E-PDT z zastosowaniem F₂BPrC jako fotosensybilizatora.

2.3. Rola cyklooksygenazy 2 (COX-2) w procesach zapalnych indukowanych PDT

Kolejny aspekt przedkładanej pracy koncentruje się również na możliwości wzmocnienia aktywności przeciwnowotworowej terapii fotodynamicznej poprzez zastosowanie ukierunkowanego fotosensybilizatora rozpoznającego związany z nowotworem stan zapalny. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że zastosowanie pochodnej bakteriochloryny funkcjonalizowanej cząsteczkami leku z grupy NLPZ - *N*-(4-hydroksyfenylo)acetamidu pozwala na aktywne targetowanie cyklooksygenazy-2 (COX-2) – enzymy związanego ze stanem zapalnym, którego nadekspresję wykazano w traktowanych komórkach nowotworowych (CT26). W pracy wykazano zwiększone powinowactwo badanej pochodnej wobec komórek śródbłonna naczyń (w kulturach komórek adherentnych oraz sieci naczyń rosnącej w kulturze 3D). Ponadto, na ich podstawie wnioskować można, że inhibicja aktywności COX-2 za pomocą ukierunkowanej PDT przyczynia się do (1) intensyfikowania apoptotycznej śmierci komórkowej po PDT, (2) zmniejszenia stężenia VEGF po protokołach z F₂BPrC oraz (3) zmniejszenia stężenia prostaglandyny E2 zarówno po terapii prowadzonej *in vitro* i *in vivo*. Zależność ta koreluje z wysoką skutecznością terapeutyczną, która związana jest również z generowaniem długoterminowej, specyficznej odpowiedzi układu odpornościowego zależnej od limfocytów typu T, Rys. 4. Obiecujące wyniki uzyskane dla opracowanego protokołu F₂BPrC-E-PDT, pozwalają zatem wnioskować, że COX-2 może stanowić potencjalny cel molekularny w terapii przeciwnowotworowej.



Rysunek 4. Schemat eksperymentu mającego na celu określenie długoterminowej odpowiedzi immunologicznej po PDT. (A) Analiza Kaplana-Maiera dotycząca przeżywalności zwierząt po F_2BPr -E-PDT z uwzględnieniem ponownego przeszczepienia komórek nowotworowych; (B) przeżywalność myszy immunokompetentnych (BALB/c) vs myszy z defektem immunologicznym (BALB/c nude) po F_2BPr -E-PDT.

2.4. Detekcja autofagii w komórkach nowotworowych po PDT oraz mechanizm jej działania w zależności od subkomórkowej lokalizacji fotosensybilizatora.

W związku z tym, że w ostatnich latach dużo uwagi poświęca się występowaniu autofagii po PDT, w pracy analizie poddano mechanizmy śmierci komórkowej oraz wyjaśniono zależności pomiędzy generowanym stresem oksydacyjnym oraz rodzajem śmierci komórkowej z uwzględnieniem autofagii zarówno jako mechanizmu prowadzącego do śmierci komórki jak i aktywności pro-przeżyciowej. Z uwagi na plejotropowy charakter autofagii w pracy określono warunki efektu fotodynamicznego, przy którym pełni ona funkcje pro-przeżyciowe oraz kierujące komórkę na drogę śmierci. Detekcji autofagii dokonano stosując wybrane inhibitory szlaków molekularnych prowadzących do powstawania autofagosomu (tj. wortmaninę - inhibitor kinazy PI3K) oraz na podstawie analizy ekspresji białek związanych z autofagią – LC3B oraz p62/SQSTM. Ze względu na wzajemne interakcje molekularne, równoległe do autofagii analizowano też obecność apoptozy post-PDT (barwienie AneksynąV-AFl488 z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, analiza aktywności kaspaz oraz białek z rodziny Bcl-2).

W oparciu o przeprowadzone badania wykazano, że mechanizm obserwowanej po PDT autofagii jest ściśle zależny od lokalizacji subkomórkowej PS oraz stosowanej dawki promieniowania. Uzyskane wyniki wskazują, że terapii fotodynamicznej powodującej uszkodzenie retikulum endoplazmatycznego (ER-PDT) - zwłaszcza przy zastosowaniu suboptymalnych dawek światła - towarzyszy autofagia o charakterze pro-przeżyciowym. Natomiast w przypadku, gdy pierwotnym miejscem fotouszkodzenia jest aparat Golgiego (Golgi-PDT) lub lizosomy (Lyso-PDT) – indukowana jest autofagia prowadząca do śmierci komórek

nowotworowych, a tym samym przyczyniająca się do uzyskania lepszych efektów terapeutycznych.

3. Podsumowanie

Przeprowadzone podczas realizacji pracy doktorskiej badania posiadają charakter interdyscyplinarny, a otrzymane wyniki zarówno w części fizykochemicznej, jak i biologicznej *in vitro* i *in vivo* pozwoliły na kompleksową ocenę wpływu zastosowanych modyfikacji strukturalnych na własności fotosensybilizatorów oraz zależności struktura - aktywność biologiczna na profil aktywności fotodynamicznej testowanych bakteriochloryn. Zastosowanie metod zaczerpniętych zarówno z dziedziny nauk chemicznych, jak również farmacji, biologii molekularnej i medycyny w połączeniu z klasycznymi metodami rozwoju nowych środków terapeutycznych pozwoliło określić skuteczność proponowanej strategii wraz z wyjaśnieniem mechanizmów molekularnych mających wpływ na całkowity obraz przedkliniczny; a co za tym idzie – uzyskanie wniosków i wyników badań, wnoszą dotychczas nieznaną lub jedynie sygnalizowaną informację o podejmowanych w projekcie problemach badawczych.

Podsumowując, podejmowane w pracy aspekty chemiczne i biologiczne związane z PDT wydają się być znaczące w dobie medycyny spersonalizowanej, która przede wszystkim uwzględnia złożoność i heterogenność chorób nowotworowych na tle możliwości modyfikacji sposobu prowadzenia leczenia w zależności od indywidualnie traktowanych przypadków chorobowych. Uzyskane wyniki mogą w przyszłości przyczynić się nie tylko do opracowania nowych schematów leczenia o wysokiej skuteczności, ale również możliwości wzmacniania aktywności klasycznych metod leczenia (m.in. poprzez zastosowanie inhibitorów lub aktywatorów wybranych szlaków molekularnych, substancji wzmacniających ich działanie bądź projektowanie terapii kombinowanych). Reasumując, w świetle dotychczasowych danych dotyczących poszukiwania fotosensybilizatorów o zwiększonej skuteczności, badane w pracy bakteriochloryny wydają się być obiecującą grupą nowych, ukierunkowanych fotosensybilizatorów III generacji zarówno do terapii fotodynamicznej, jak również nowych eksperymentalnych strategii przeciwnowotworowych, do których zalicza się fotoimmunoterapia

Podsumowanie dorobku naukowego

Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie JCR: **9**

Materiały konferencyjne w czasopismach znajdujących się w bazie JCR: **3**

Publikacje w czasopismach innych niż znajdujące się w bazie JCR: **2**

Liczba cytowań¹: **76**

Indeks Hirscha¹: h = **5**

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor, zgodny z 5-letnim IF): **57.889**

Liczba wystąpień konferencyjnych: **66**

Lista prac związanych z tematem rozprawy doktorskiej lub zawierających część przedstawionych w niej wyników:

1. **B. Pucelik** et al. "Design of Pluronic-based formulation for enhanced redaporfin-photodynamic therapy against pigmented melanoma" *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, 8, 22039-55; **IF=7.823**.
2. A. Luz, **B. Pucelik**, L.G. Arnaut et.al. "Translating phototherapeutic indices from in vitro to in vivo photodynamic therapy with bacteriochlorins", *Lasers Surg. Med.*, 2018, DOI: 10.1002/lsm.22931; **IF=2.61**.
3. **B. Pucelik** et al. "Fluorination of Phthalocyanine Substituents: Improved Photochemical properties and Enhanced Photodynamic Efficacy after Optimal Micellar Formulations" *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, 124, 284-298; **IF=4.187**.
4. J.M. Dąbrowski, **B. Pucelik**, L.G. Arnaut et.al. "Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers" *Coord. Chem. Rev.*, 2016, 325, 67-107; **IF=12.743**.
5. J.M. Dąbrowski, **B. Pucelik**, L.G. Arnaut et al. „Towards tuning PDT relevant photosensitizer properties: comparative study for the free and Zn²⁺ coordinated meso-tetrakis-[2,6-difluoro-5-(N-methylsulfamoyl)phenyl]porphyrin" *J. Coord. Chem.*, 2015, 68, 3116-3134; **IF=1.304**.
6. J.M. Dąbrowski, **B. Pucelik** „Od pomysłu do apteki: badania nad nowymi lekami do terapii fotodynamicznej nowotworów (PDT)", *Niedzialki*, 2016, 3, 52-64.

Prace niezwiązane z rozprawą doktorską:

7. A. Kawczyk-Krupka, **B. Pucelik**, J.M. Dąbrowski et al. "Photodynamic therapy as an alternative to antibiotic therapy for the treatment of infected leg ulcers", *Photodiag. Photodyn. Ther.*, 2018, DOI: 10.1016/j.pdpdt.2018.05.001; **IF=2.457**.
8. **B. Pucelik** et al. "Properties of halogenated and sulfonated porphyrins relevant for the selection of photosensitizers in anticancer and antimicrobial therapies" *PLoS ONE*, 2017, 12(10), e0185984; **IF=3.394**.
9. A. Regiel-Futyrka, J.M. Dąbrowski, **B. Pucelik** et al. "Bioinorganic antimicrobial strategies in the resistance era" *Coord. Chem. Rev.*, 2017, 351, 76-117; **IF=12.743**.
10. J. M. Dąbrowski, **B. Pucelik**, W. Macyk et al. "New hybrid materials based on halogenated metalloporphyrins for enhanced visible light photocatalysis" *RSC Adv.*, 2015, 5, 93252-93261; **IF=3.257**.

¹ na podstawie bazy danych Web of Science z dnia 10.06.2018