

dr hab. Aleksandra Rusin  
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie  
Centrum Badan Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów  
Wybrzeże Armii Krajowej 15  
44-100 Gliwice

Gliwice, 13.09.2016

**Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Cyzy, zatytułowanej „Właściwości spektroskopowe i fotochemiczne nowych fotosensybilizatorów dla potrzeb terapii fotodynamicznej”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Nowakowskiej, w zespole, który ma udokumentowane osiągnięcia w zakresie oceny przydatności fotosensybilizatorów do terapii fotodynamicznej. Zważywszy, że w guzie nowotworowym zachodzi wzmożona akumulacja fotouczulacza w stosunku do tkanek prawidłowych, a światło jest dostarczane do zmiany w sposób zlokalizowany, terapia fotodynamiczna (PDT) jest z założenia metodą leczenia wykazująca selektywność wobec zmiany nowotworowej i dlatego jej zastosowanie pozwala w niektórych przypadkach znacząco ograniczyć efekty niepożądane związane z leczeniem. Podjęcie przez doktorantkę wysiłków rzetelnego scharakteryzowanie właściwości fizykochemicznych nowych fotouczulaczy z grupy ftalocyjanin jest niezwykle cenne i odpowiada zapotrzebowaniu społecznemu na wprowadzenie nowych selektywnych terapii przeciwnowotworowych.

Doktorantka opisała we wstępie kryteria, jakie powinna spełniać substancja chemiczna, aby można było ją uznać za czynnik przydatny do PDT, obejmujące właściwości fizykochemiczne i efekty biologiczne wywoływane w organizmie. Zgodnie z tymi założeniami, autorka postanowiła ocenić reaktywność fotochemiczną, zdolność do efektywnej produkcji tlenu singletowego i innych reaktywnych form tlenu oraz stabilność badanych związków. Równocześnie poddała analizie widma absorpcji zwracając uwagę, czy nie pokrywają się z pasmami absorpcji endogennych barwników wewnątrzkomórkowych.

Działanie biologiczne omawianych ftalocyjanin, w tym aspekt toksyczności w ciemności, selektywne zatrzymywanie w tkance nowotworowej przez kilkadziesiąt godzin oraz brak efektów fototoksycznych w zdrowych tkankach nie został w pracy poruszony i będzie przedmiotem dalszych badań.

Do najważniejszych osiągnięć pracy zaliczam wnikliwe i rzetelne omówienie właściwości fizykochemicznych czterech związków z grupy ftalocyjanin oraz jednego należącego do subftalocyjanin. Jako, że związki te stanowią nowe indywidua chemiczne, niebadane wcześniej pod kątem przydatności w PDT, Pani mgr inż. Cyza zajęła się określeniem ich widm absorpcji i emisji, wydajności kwantowej fluorescencji, wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego, fotostabilnością, a także oddziaływaniem z błonami lipidowymi. Doktorantka zaobserwowała, że badane związki wykazują silną absorpcję promieniowania w obszarze okna terapeutycznego (wyjątkiem była jedynie subftalocyjanina) oraz charakteryzują się wysokimi molowymi współczynnikami absorpcji, wykazując jedynie słabą fluorescencję. Badania Doktorantki pokazują, że omawiane ftalocyjaniny charakteryzują się wysoką zdolnością generowania tlenu singletowego. Jednocześnie związki te poddają się fotobłaknięciu, dzięki czemu można oczekiwać, że nie będą one nadmiernie trwałe w organizmie i dzięki temu nie będą narażały pacjenta na długotrwałe skutki uboczne po zakończeniu leczenia. Ponadto, autorka uwzględniając tendencję badanych związków do tworzenia agregatów zaproponowała rozwiązanie polegające na zamknięciu ich w nośniku liposomalnym. Taka strategia może mieć w przyszłości dodatkową zaletę oprócz zapobieganiu zmniejszeniu efektywności działania fotouczulacza wynikającego z jego agregacji, a mianowicie, o ile zastosuje się odpowiednie targetowanie liposomów, można dodatkowo zwiększyć selektywność działania fotouczulacza na komórki nowotworowe. Wyniki analiz fizykochemicznych niewątpliwie zachęcają do kontynuowania badań mających na celu określenie efektów biologicznych, jakie badane przez Doktorantkę fotouczulacze będą wywoływać w żywym organizmie.

Mam jednak uwagę dotyczącą braku danych fizykochemicznych potwierdzających budowę badanych związków. Fotosensybilizatory badane w pracy zsyntetyzował dr Łapoka i mgr Guta, a metoda syntezy została opisana w rozdziale III.1.2. Autorka podaje, że strukturę badanych związków potwierdzono za pomocą spektroskopii  $^1\text{H}$  NMR, IR i analizy elementarnej (str. 69). Takie stwierdzenie nie powinno jednak zwalniać autorki rozprawy od przedstawienia tych danych w pracy lub wskazania innych opracowań, w których dane te

mogą być dostępne. Na przykład, związek oznaczony jako MgPcI<sub>4</sub> jest scharakteryzowany w publikacji naukowej, której doktorantka jest współautorką (J.Photochem. Photobiol. A: Chem. **286**, 55, 2014). Jeżeli metoda syntezy pozostałych związków jest opublikowana, to warto przytoczyć odnośnik literaturowy. Podobna uwaga odnosi się do preparatyki metalofalocyjanin.

Kolejnym pytaniem jakie nasunęło mi się po przeczytaniu rozprawy było: dlaczego nie porównano wydajności generowania tlenu singletowego tych związków z używanymi w PDT tetrapirołowymi pochodnymi, na przykład Photofrinem czy Foscanem? Wydaje się, że zastosowanie tych związków jako związków referencyjnych mogłoby ułatwić ocenę badanych związków jako potencjalnych fotouczulaczy.

Chciałabym także prosić Doktorantkę o wyjaśnienie pewnych szczegółów analizy oddziaływania badanych ftalocyjanin i subftalocyjaniny z błonami liposomów przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Czy intensywność sygnału fluorescencyjnego posłużyła za podstawę do stwierdzenia, że „największą zdolność do penetracji błony lipidowej zaobserwowano w przypadku ftalocyjaniny MgPcI<sub>4</sub> (Str. 171)? Czy autorka porównała zdolność penetracji błony pęcherzyka przez ftalocyjaniny na podstawie wzrokowego oszacowania intensywności sygnału fluorescencyjnego ftalocyjaniny w obrębie pęcherzyka, czy też mierzyła intensywność sygnału fluorescencyjnego (przeliczonego na przykład na jednostkę powierzchni/objętości pęcherzyka) za pomocą narzędzi analizy obrazu?

Mam także kilka dodatkowych drobnych uwag, które nie wpływają na ostateczną ocenę pracy:

Str. 42. Protoporfiryna jest typowym przedstawicielem związku amfifilowego lub nawet hydrofilowego (posiada dwie grupy COOH), natomiast bakteriochlorynę czy feoforbid należy raczej zaliczyć do związków hydrofobowych.

Str. 45. W tabeli 2: kwasy lewulinowe nie są fotouczulaczami, lecz substratami do syntezy przez organizm odpowiednich tetrapirołowych pochodnych, które stają się fotouczulaczami.

Str. 77. Rysunek 18. Czy w tym przypadku zastosowano wzbudzenie przy długości fali 342nm?

Str. 101. Nazwa DPBF jest podana nieprawidłowo: powinno być izobenzofuran, a nie benzoizofuran

Pomimo tych drobnych uwag muszę przyznać, że czytanie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Małgorzaty Cyzy sprawiło mi ogromną przyjemność. Opisane własności fizykochemiczne wskazują, że autorka odkryła atrakcyjne związki o potencjalnym zastosowaniu w PDT.

Rozprawa doktorska jest przygotowana w sposób niezwykle staranny, układ treści jest zasadniczo typowy dla prac doktorskich. Na początku pracy autorka wyjaśnia stosowane w pracy skróty i symbole, przez co znakomicie ułatwia rozumienie tekstu. Praca obejmuje obszerny wstęp (47 stron), opis części doświadczalnej (102 strony) oraz podsumowania i wnioski (5 stron). We wstępie autorka przedstawiła obecny stan wiedzy na temat fotosensybilizatorów stosowanych w terapii fotodynamicznej i poświęciła jeden rozdział liposomalnym nośnikom leków, których zastosowanie zaplanowała w celu podniesienia efektywności terapeutycznej badanych przez siebie fotouczulaczy. Rozdział III. pracy, prezentujący część doświadczalną ma nieco mniej typowy dla większości prac doktorskich układ, gdyż autorka podzieliła część doświadczalną na niezależne podrozdziały tematyczne, z których każdy zawiera opis metod, wyników, elementy ich dyskusji oraz wnioski. Tym niemniej, takie rozwiązanie pod wieloma względami ułatwia czytanie i zrozumienia toku rozumowania dotyczącego poszczególnych aspektów analizowanych w pracy.

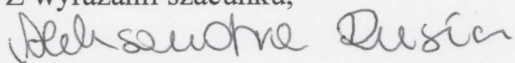
Autorka wykazała się znakomitą znajomością przedmiotu cytując 222 pozycje literaturowe, z których 80% stanowią prace z ostatnich 10 lat. Na podkreślenie zasługuje także wysoka jakość rysunków i schematów. Praca jest napisana poprawnym językiem polskim i trudno mi było znaleźć pojedyncze błędy edytorskie (np. str. 39.: beznoporfiryn zamiast benzoporfiryn; str. 42. wiersz 9.: od około zamiast powyżej; str. 50. wiersz 7 i 8.: cholesterolem niskiej gęstości (LDL) zamiast lipoproteinami niskiej gęstości, (LDL); str. 57.: H-agregaty i J-agregaty zamiast agregaty typu H i agregaty typu J).

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską i publikacją w *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2014), której Pani Cyza jest drugą autorką oraz mając na uwadze jej liczne doniesienia konferencyjne mogę stwierdzić, że wykazuje ona wysokie predyspozycje do planowania, prowadzenia i publikowania badań naukowych. Rozprawa spełnia warunki określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach

naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami).

W podsumowaniu, wzięwszy pod uwagę zakres prac laboratoryjnych wykonanych przez Doktorantkę, dogłębne przeanalizowanie otrzymanych wyników oraz spełnienie wszystkich kryteriów stawianych pracom doktorskim, zwracam się do Wysokiej Rady o dopuszczenie mgr inż. Małgorzaty Cyzy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,

  
Aleksandra Rusin