



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wrocław 01.06.2018

Dr hab. inż. Julita Kulbacka
Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej
Wydział Lekarski
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich
ul. Chałubińskiego 10
50-368 Wrocław
email: julita.kulbacka@umed.wroc.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Barbary Pucelik

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

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Barbary Pucelik została wykonana w Zakładzie Chemii Nieorganicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Grażyny Stochel ora dr-a Janusza M. Dąbrowskiego.

Tematyka rozprawy doktorskiej skupia się na zagadnieniu jak poprawić terapie przeciwnowotworowe poprzez skuteczne i celowane dostarczanie leku oraz jego modyfikacje. Rozprawa mgr Barbary Pucelik doskonale wpisuje się w nurt badań, które są wyzwaniem dla wielu badaczy, a mianowicie dotyczący możliwości wzmocnienia przeciwnowotworowej aktywności PDT z zastosowaniem modyfikowanych fotouczulaczy z grupy bakteriochloryn. Na uwagę zasługuje fakt, że praca została zrealizowana w oparciu o trzy projekty Narodowego Centrum Nauki (Sonata, Sonata Bis i Iuventus Plus) z tematyki terapii fotodynamicznej oraz we współpracy z portugalskim Uniwersytetem w Coimbrze. Rozprawa obejmuje przemyślane etapy badawcze, począwszy od opracowania nowej formułacji

bakteriochloryny w micelach polimerowych, badań na mysim modelu *in vitro* i *in vivo*, do analizy mechanizmów odpowiedzi immunologicznej, stresu oksydacyjnego i autofagii. Praca stanowi obszerne opracowanie zawarte na 246 stronach drukowanych i 59 stronach Suplementu załączonych na nośniku CD.

Praca na wstępie zawiera streszczenie zarówno w języku polskim jak i angielskim, które w zwięzły sposób wprowadzają do zagadnień podejmowanych w dysertacji. Kolejno, Autorka przedstawia swój dorobek naukowy obejmujący 6 publikacji związanych z tematyką pracy, 3 artykuły w trakcie publikacji oraz 4 publikacje poza zakresem badawczym rozprawy doktorskiej. W tym miejscu jako dodatkową informację warto dodać punktację czasopism. Kolejnym działem jest wykaz skrótów stosowanych w rozprawie, do którego można było również dołączyć nazwy linii komórkowych zawartych w streszczeniu. Pierwszym rozdziałem rozprawy jest bogato ilustrowany *Przegląd literaturowy*, obejmujący 58 stron, który mógłby stanowić podstawę do pracy przeglądowej. Autorka w tym rozdziale opisuje problematykę chorób nowotworowych, ich molekularne mechanizmy i cele terapeutyczne. W kolejnych podrozdziałach zapoznajemy się z zagadnieniem terapii fotodynamicznej, jej fotochemicznymi i fotofizycznymi aspektami. Kolejna część przeglądu zawiera omówienie zagadnienia stresu oksydacyjnego, reaktywnych form tlenu i komórkowych systemów obronnych. Następnie Autorka skupia się na zwięzłym opisie fotosensybilizatorów i ich właściwości. Kolejne podrozdziały dotyczą mechanizmów biologicznych indukowanych terapią fotodynamiczną, obejmujące efekty komórkowe, rodzaje śmierci komórkowej zależne od lokalizacji i działania fotouczulacza. Autorka bardzo dobrze opisała niezwykle istotne rozdziały dotyczące wpływu PDT na kształtowanie krótko- i długoterminowej przeciwnowotworowej odpowiedzi układu odpornościowego oraz efekty naczyniowe. W końcowych podrozdziałach Doktorantka wskazuje sposoby spotęgowania efektu fotodynamicznego poprzez zwiększenie selektywności i aktywności substancji fotouczulającej przy pomocy łączenia z innymi lekami, przeciwciałami, funkcjonalizację czy enkapsulację. Autorka wskazuje nanonośniki a w szczególności micelle polimerowe jako systemy do optymalnego i kontrolowanego dostarczania fotouczulacza do komórek nowotworowych. W tym obszernym i wyczerpującym rozdziale przeglądowym zabrakło danych źródłowych, w oparciu o które zostały przygotowane rysunki (np. 2, 4, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 25). Pojawiły się również zapożyczone i używane potocznie z języka angielskiego słowa jak np. kostymulujące (str.60) czy targetowane (str.65).

Przedstawiając *Cele pracy* Doktorantka wskazuje pięć głównych problemów badawczych: (1) zbadanie wpływu modyfikacji strukturalnych i funkcjonalizacji fotouczulaczy na aktywność biologiczną, (2) opracowanie nowej formułacji bakteriochloryn, (3) zbadanie efektów komórkowych, naczyniowych i immunologicznych, (4) ocena możliwości nabycia przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej, (5) zbadanie mechanizmu śmierci komórkowej. Doktorantka wskazuje, również 7 szczegółowych celów badawczych.

Autorka zastosowała niestandardowy układ pracy, ponieważ kolejny i najbardziej obszerny rozdział to *Część eksperymentalna*, którą podzielono na dwie części: *Materiały i metody* oraz *Wyniki i dyskusja wyników*. Materiał dotyczący części wykonawczej obejmujący 59 stron, załączono na nośniku CD. Respektuję ten pomysł Autorki rozprawy, domyślając się, że miała na uwadze ostateczny rozmiar pracy przedłożony do druku. Część doświadczalna przedstawia szczegółowo opis materiału biologicznego komórkowego i zwierzęcego, jego przygotowanie do doświadczeń oraz zastosowane techniki. Obszerny model badawczy jaki wybrała Doktorantka wskazuje na ogromny wysiłek i czas poświęcony na wykonanie pracy. Obiektem badań były mysie komórki nowotworowe pochodzące z płuc, jelita grubego, skóry w odniesieniu do mysich i ludzkich prawidłowych komórek śródbłonna naczyń. Zastosowano również trzy modele zwierzęce BALB/c, BALB.c nude oraz C357BL/6J. Metodologia wykonania jest opisana dość dokładnie, a ilość przeprowadzonych eksperymentów budzi moje uznanie. W części dotyczącej opisu modelu zwierzęcego zabrakło szczegółów zastosowanej próby badawczej na jeden eksperyment. W kontekście oceny optymalnego czasu akumulacji bakteriochloryn Autorka zastosowała pomiar fluorescencji w czasie 2-24h z zastosowaniem czytnika płytek wielodołkowych. Czy wyniki otrzymane tą metodą były porównywane i porównywalne z metodą obserwacji akumulacji fotouczulacza ocenianego metodą mikroskopii konfokalnej lub fluorescencyjnej?

Następną częścią są niekonwencjonalnie przedstawione *Wyniki i dyskusja wyników*, w formie niezależnych działów tematycznych. Sama Autorka wskazuje celowość takiego podziału, który ma ułatwić zrozumienie poszczególnych aspektów PDT podejmowanych w dysertacji. Według mojej opinii taki nowatorski układ daje wyobrażenie przyszłych publikacji, których podstawą będą uzyskane i zaprezentowane w rozprawie wyniki. Każda z części zawiera wstęp, wyniki i krótkie podsumowanie. Pierwszy dział dotyczy potencjalnego wykorzystania fotouczulaczy z grupy bakteriochloryn w terapii czerniaka.

Doktorantka przeprowadziła badania na modelu czerniaka B16F10, stosując do terapii nową, wrażliwą na zmiany pH formulację Redaporfinu enkapsulowanego w micelach polimerowych opartych na poloksamerze Pluornik 123. Istotnym i zamierzonym efektem było ukierunkowanie działania fototerapeutycznego na mikrośrodowisko znajdujące się wokół guza, gdzie pH jest niższe niż w tkance właściwej guza. Doktorantka przeprowadziła proces optymalizacyjny badanych formulacji w oparciu o micidele F127 i micidele oparte na pluroniku P123, wskazując lepszą efektywność fotouczulacza w micelach wykonanych w oparciu o Pluronik 123. Przeprowadzone wyniki pozwalają Doktorantce na zaproponowanie celowanego protokołu wobec komórek czerniaka.

W drugiej części wyniki obejmują analizę odpowiedzi guzów nowotworowych na działanie PDT. Autorka przeprowadziła porównanie skuteczności fototerapeutycznej, stosując trzy różne protokoły: V-PDT, E-PDT i C-PDT. Przeprowadzone analizy cytokin pozwoliły Autorce zaobserwować wzrost aktywności IL-6, KC, czynnik MIG a także MIP-1beta po V-PDT co plasuje je jako markery skutecznej terapii po zastosowanym protokole. Natomiast E-PDT powodowała wzrost ekspresji MIP-2, IP-10, MCP-1, TNF-alfa i GM-CSF, oraz promocję swoistej odpowiedzi układu immunologicznego.

W następnym dziale Doktorantka skupiła się na roli cyklooksygenazy 2 w procesach zapalnych indukowanych PDT. W numeracji działu wkradł się błąd, zamiast numeru 5.4 powinno być 3.3. W tej części Autorka skupiła się na badaniach na modelu raka jelita grubego, podejmujących próbę modulowania stanu zapalnego indukowanego terapią fotodynamiczną z użyciem nowego fotouczulacza o działaniu celowanym w kierunku COX-2. Jako nowy lek zastosowano pochodną bakteriochloryny posiadającą w swojej strukturze acetaminofen. Ideą przyświecającą aplikacji takiego „inteligentnego” fotouczulacza, było celowane działanie w obrębie stanu zapalnego. Dodatkowo wprowadzono inhibitor, którego celem było utrzymanie stanu zapalnego na minimalnym poziomie. Doktorantka otrzymała bardzo obiecujące wyniki wskazujące jak terapia zastosowana miejscowo pozwala stymulować odpowiedź systemową przy zastosowaniu inhibitorów COX-2.

Ostatnia część opisująca wyniki koncentruje się na mechanizmach śmierci komórkowej zależnych od lokalizacji fotouczulacza na mysim modelu komórek nowotworowych płuca. Doktorantka przeprowadziła optymalizację czasu inkubacji z sulfonamidową pochodną bakteriochloryny (F₂BMet), analizując również wspólną lokalizację w strukturach komórkowych. Opracowana metodyka i wyniki w warunkach

in vitro stanowiła podstawę do dalszej części oceny rodzaju śmierci komórkowej na modelu zwierzęcym. Autorka wskazuje, że za uszkodzeniem retikulum endoplazmatycznego (ER) postępuje autofagia, ale z dużym stopniem przeżycia komórek nowotworowych. Natomiast kiedy PDT działa foto-destruktywnie w aparacie Golgiego i lizosomach indukowana jest autofagia, która prowadzi do śmierci komórek nowotworowych co wskazuje na lepszy efekt terapeutyczny.

Doktorantka przeprowadziła liczne badania, które zaowocowały wieloma oryginalnymi i interesującymi wynikami. Ostatni rozdział *Podsumowanie i wnioski* zawiera esencję z przeprowadzonych badań i otrzymanych rezultatów. Rozprawa doktorska mgr Barbary Pucelik zawiera obszerny warsztat metodyczny, odpowiedni dobór substancji fotouczulających, oryginalne i cenne wyniki, staranność ich opracowania, ciekawe i właściwe ich przedstawienie oraz bardzo dojrzałą dyskusję. Zauważam nawet, że ilość otrzymanych danych ujętych w pracy znacznie przekracza wymagania stawiane w przewodach doktorskich. W finalnej części Autorka zawiera obiecujące Perspektywy badawcze, wskazujące na kontynuację podjętej tematyki terapii fotodynamicznej, która jest selektywną i stosunkowo bezpieczną metodą a mimo swojej dość długiej historii nie jest metodą do końca poznaną. Popularyzacja i podejmowanie badań dotyczących PDT otwiera nowe możliwości w onkologicznym leczeniu pacjentów. Całość rozprawy kończy lista 295 pozycji literaturowych co świadczy o dobrej znajomości Autorki w reprezentowanej dziedzinie naukowej.

W podsumowaniu stwierdzam, że Doktorantka zrealizowała postawione w pracy cele. Przedstawiona do oceny rozprawa stanowi cenny wkład w badania nad nanoukładami w kontekście terapii fotodynamicznej. Szczególnie ważną częścią rozprawy jest propozycja nowej formułacji fotosensybilizatora z grupy bakteriochloryn i jego modyfikacji oraz dogłębna analiza odpowiedzi immunologicznej po PDT w różnych typach nowotworów. Praca napisana jest dojrzałym językiem naukowym i zaopatrzona w starannie dopracowane schematy. Wartość naukową potwierdzają również oryginalne prace Doktorantki opublikowane w tej tematyce. Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów edytorskich, co przy takiej objętości pracy jest możliwe. Nie umniejsza to jednak wartości całej rozprawy, którą oceniam bardzo wysoko.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Barbary Pucelik 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 późniejszymi zmianami. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Barbary Pucelik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Pragnę również podkreślić walory aplikacyjne pracy i znaczący wkład zaprezentowanych wyników w rozwój terapii fotodynamicznej, podniesienia jej efektywności i zminimalizowania skutków ubocznych. **Mając na uwadze, że przedstawione w dysertacji dane eksperymentalne i otrzymane wyniki są na najwyższym poziomie, co świadczy o dojrzałości naukowej doktorantki, oraz bogaty dorobek naukowy Autorki, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.**


dr hab. inż. Julita Kulbacka