



Katowice

06-06-2018

Dr hab. Robert Musioł
Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski

Recenzja pracy doktorskiej pani mgr Barbary Pucelik pt „Molekularne mechanizmy aktywności biologicznej modyfikowanych bakteriochloryn jako fotosensybilizatorów w terapii fotodynamicznej (PDT)” wykonanej w Zespole Fizykochemii Koordynacyjnej i Bionieorganicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem Pani profesor dr hab. Grażyny Stochel oraz dr Janusza Dąbrowskiego.

Wykorzystanie światła jako źródła energii oraz efektów terapeutycznych sięga kilku tysięcy lat wstecz, wraz z pierwszymi opisanymi próbami leczenia zmian skórnych przy pomocy roślin i światła słonecznego. Z kolei zastosowanie fotouczulaczy w połączeniu ze światłem w leczeniu nowotworów znane jest już od ponad stu lat. Wobec tak bogatej historii można odnieść wrażenie, iż zgoła wszystkie ważne zjawiska zostały już w terapii fotodynamicznej opisane, a dalsze poszukiwania nie wniosą nowej jakości. Badania prowadzone w uznanym zespole Pani prof. Grażyny Stochel, w tym rozprawa autorstwa Pani mgr Barbary Pucelik zadają kłam tym stwierdzeniom. Od nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej wymagamy przede wszystkim skuteczności oraz selektywności, która przekłada się na bezpieczeństwo stosowania. Tymczasem większość znanych sposobów leczenia nowotworów wiąże się z szeregiem skutków ubocznych niejednokrotnie zagrażających życiu pacjentów podczas gdy pojawiająca się lekooporność i wznowy ograniczają skuteczność leczenia. Selektywność w leczeniu nowotworów opiera się na drobnych różnicach w biochemii komórek nowotworowych oraz normalnych. Przykładem takich różnic jest pojawienie się specyficznego celu molekularnego w wyniku mutacji, zwiększona ekspresja białek lub zapotrzebowanie na czynniki odżywcze. W terapii fotodynamicznej wykorzystuje się te różnice, dzięki czemu możliwe jest osiągnięcie znacznie silniejszego efektu w komórkach nowotworu niż otaczającej tkance. Ponadto zdolność fotouczulaczy do emisji światła w wyniku wzbudzenia pozwala



uzyskać efekt diagnostyczny obok terapeutycznego. Głównym zadaniem stojącym przed naukowcami parającymi się tym trudnym lecz inspirującym zagadnieniem jest pozyskanie takich fotouczulaczy, które połączą w sobie wszystkie pożądane cechy. W ten nurt wpisuje się przedstawiona mi do recenzji rozprawa opisująca wyniki badań autorki prowadzonych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie oraz w ramach współpracy z Uniwersytetem w Coimbrze.

Praca ma układ mniej więcej klasyczny ze wstępem zawierającym przegląd literatury oraz opis aktualnego stanu techniki, opis celów pracy oraz część eksperymentalną zawierającą dyskusję wyników i przegląd metod. Całość zamknięta została posumowaniem z wnioskami oraz, co godne pochwały krótkim acz treściwym omówieniem perspektyw badawczych. Rozdział materiały i metody zawiera jedynie informację o tym, że ta część została opracowana osobno w postaci suplementu dołączonego do rozprawy w formie elektronicznej. O ile decyzja autorki wydaje się słuszna w świetle objętości rozprawy liczącej ponad 240 stron, to sam podział pracy, w takiej sytuacji mógł zostać uproszczony. Wyniki wraz z dyskusją to po prostu opis badań własnych z komentarzem a właściwa część eksperymentalna znajduje się właśnie w liczącym 62 strony suplementcie. Jednak nie poczytuję takiego podejścia za błąd, gdyż nie ma większego wpływu na odbiór pracy. Tematyka oraz kolejność rozdziałów wynikają zapewne z porządku chronologicznego prowadzonych i publikowanych badań i nie budzą większych wątpliwości. Jedynie podrozdziały 3.1.2.A-D wydają się być nie na miejscu pomiędzy opisem widm absorpcyjnych a molowych współczynników absorpcji. Myślę, że zebranie ich w osobny podrozdział poprawiłoby klarowność rozprawy.

Przegląd literaturowy liczy ponad 50 stron i dobrze przedstawia szereg aspektów kluczowych dla zrozumienia terapii fotodynamicznej. Autorka porusza zarówno wpływ struktury i sprzężenia orbitali na widma elektronowe, podstawy farmakokinetyki oraz, znacznie bardziej szczegółowo, aspekty immunologiczne PDT. Przy tak szerokim ujęciu nietrudno o wybiórczość lub trywializowanie niektórych zagadnień, czego udało się szczęśliwie uniknąć. Nie licząc drobnych uwag natury edytorskiej nie znajduję uchybień w tym rozdziale.



Opis przeprowadzonych badań i omówienie wyników to najbardziej rozwinięta część pracy licząca blisko 130 stron i jak już nadmieniałem podzielona na osobne podrozdziały skupione na analizie zależności struktura-aktywność dla testowanych fotouczulaczy, oraz dla fotouczulaczy enkapsulowanych oraz analizę odpowiedzi guzów nowotworowych na terapię, badaną na modelu mysim. W ramach pracy Pani Barbara Pucelik przebadła cztery pochodne bakteriochloryny zaprojektowane z uwzględnieniem aktualnej wiedzy w zakresie pożądanych cech strukturalnych oraz mechanizmów działania. Związki zostały pozyskane we współpracy z zespołem Prof. M Pereiry z Uniwersytetu w Coimbrze. Doktorantka przeprowadziła drobiazgowo badania podstawowych parametrów fizykochemicznych w tym charakterystyki spektralnej, lipofilowości, stabilności podczas naświetlania. Pozyskane wyniki są dobrze opisane oraz poddane właściwej dyskusji w odniesieniu do aktualnej literatury. Odbiór tego rozdziału jest zdecydowanie pozytywny mimo to pojawiają się drobne nieścisłości, które warto w tym miejscu skomentować. Przykładowo, na stronie 103 autorka w komentarzu do wartości molowych współczynników absorpcji z tabeli 7 stwierdza że „można zauważyć, że w przypadku porfiryryny ” współczynniki te posiadają niewielkie wartości. Niestety w Tabeli 7 nie udało mi się znaleźć wartości dla porfiryryny a jedynie dla czterech pochodnych bakteriochloryn. Dyskusja dotycząca lipofilowości jest nieco nadmiernie rozbudowana, a fragment dotyczący stosowalności kodowania SMILES niepotrzebny. Wyznaczanie lipofilowości przy pomocy programów komputerowych jest dziś już powszechnie znaną techniką. Jedyne problemy mogą pojawić się w pracy z niektórymi programami darmowymi, które nie liczą logP dla bardziej rozbudowanych struktur, a znaczna część wszystkich robi to zwyczajnie źle. Z tym większym zadowoleniem zauważyłem że autorka pokusiła się o zmierzenie tej wartości w pracochłonnym eksperymencie z wytrząsaniem. Dla wszystkich związków wyznaczony został efekt fotodynamiczny w postaci letalnych dawek światła. Skrót LLD₅₀ nie jest typowo stosowany w literaturze stąd warto umieścić go w spisie skrótów. Autorka wyjaśnia go dopiero na stronie 121 mimo że wcześniej pojawia się on np. na stronie 99. Szczególnie wartościowym rozwinięciem badań jest badanie farmakokinetyki i aktywności *in vivo* na myszach obarczonych nowotworem jelita. Niestety nigdzie nie znalazłem liczby zwierząt wykorzystanych w tych eksperymentach, co w połączeniu z nieco pobieżnym opisem analizy statystycznej (opisano dokładniej jedynie badania immunologiczne) pozostawia niedosyt. Bardzo dobrze natomiast, należy odebrać opis oraz wnioski przedstawione do



analizy struktury, dystrybucji fotouczulaczy oraz możliwości terapeutycznych. Autorka pokazuje jak ważne jest kompleksowe projektowanie leków uwzględniające obok cech spektroskopowych również tendencje do kumulacji w określonych kompartmentach, a co za tym idzie preferencje wobec konkretnego protokołu terapeutycznego.

Kolejne podrozdziały zawierają analizę odpowiedzi organizmu na czynnik terapeutyczny, ze szczególnym uwzględnieniem reakcji układu immunologicznego oraz wpływu rodzaju śmierci komórkowej na procesy post-terapeutyczne. Terapia fotodynamiczna charakteryzuje się zdolnością do pobudzania układu odpornościowego co prowadzić może do skutecznej eliminacji komórek nowotworowych nawet poza naświetlanym polem oraz do powstania trwałej odpowiedzi. Procesy te uzależnione są przede wszystkim od powstania stanu zapalnego i rodzaju śmierci komórkowej, która może pobudzać układ immunologiczny stanowiąc jednocześnie źródło antygenów. Te aspekty doktorantka porusza w swoich badaniach uwzględniając zmiany poziomu wybranych mediatorów stanu zapalnego w układzie. Podrozdział 3.2 uzupełniony został poprawną dyskusją wyjaśniającą wybór konkretnych cytokin a także interpretacją otrzymanych wyników. Niestety, nie zawsze interpretacja autorki jest oczywista dla czytelnika, który zbyt często musi polegać na wybranych faktach. Przykładowo, nie jest jasne czy i jak wyniki badania morfologii podane w tabeli 19 zostały uśrednione. Natomiast tabele 20 i 20 są zdecydowanie za mało czytelne. Nie jest oczywiste co oznaczają konkretne rodzaje strzałek (nie podano legendy). Dodatkowo w suplemencie nie ma danych dotyczących 24h a jedynie 3h i 72h co dodatkowo utrudnia śledzenie dyskusji. Według tabeli z suplementu dane dla F₂BPrC (pochodnej paracetamolowej) po 72h wskazują na podobne zmiany IL15 oraz IL13, podczas gdy na stronie 157 można przeczytać że zanotowano znaczny wzrost pierwszej interleukiny (po 24h).

Problematyka wpływu stanu zapalnego na krótko i długoterminową odpowiedź układu immunologicznego kontynuowana jest w rozdziale błędnie oznaczonym jako 5.4 (powinno być 3.4). Autorka przedstawia znaczenie ekspresji oraz aktywności COX-2 w komórkach nowotworowych poddanych PDT postulując że fotouczulacz zawierający fragment inhibitora cyklooksygenazy (paracetamol) powinien rozpoznawać tkanki charakteryzujące się procesem zapalnym". Może źle interpretuje słowo „rozpoznawać” ale wydaje mi się, że to stwierdzenie jest mocno przesadzone.



Rozpoznawanie może sugerować kumulację w takich tkankach. Jednak w dyskusji zasygnalizowano jedynie że znaczący wzrost poziomu COX-2 zauważa się dopiero po terapii. Brakuje w tym miejscu pełniejszej dyskusji nad poziomem cyklooksygenazy oraz prostaglandyn w komórkach nowotworowych zwłaszcza tych wykorzystywanych w pracy. Wyniki opisane w rozdziale 3.3.3 mogą też sugerować, że dochodzi do blokowania enzymu np. w wyniku uwolnienia cząsteczek inhibitora z pochodnej F₂BPrC (fotodegradacja?). W świetle pojawiających się w literaturze propozycji farmakofora dla inhibitorów COX-2 trudno oczekiwać, że będzie się tak zachowywać cała cząsteczka fotouczulacza. Hipoteza rozpoznawania tkanek objętych stanem zapalnym lub przynajmniej o wyższym poziomie cyklooksygenazy potwierdzona została częściowo w rozdziale 3.3.4. Niestety autorka nie uwzględniła w dyskusji możliwego wpływu różnych parametrów fizykochemicznych zastosowanych fotouczulaczy na otrzymane wyniki. Pochodna paracetamolowa kumuluje się w większym stopniu w komórkach niż prostsza bakteriochloryna, ale może to wynikać przede wszystkim z większej lipofilowości (LogP związku F₂BPrC jest 2x większy niż F₂BMet). Potwierdzenie tej alternatywnej hipotezy można też zauważyć w eksperymencie z kalceiną AM, która kumuluje się w komórkach o nieuszkodzonej błonie a więc środowisku preferującym związki lipofilowe przed amfifilowymi. Równie ważnym z uwagi na powstanie stanu zapalnego parametrem jest lokalizacja subkomórkowa fotouczulacza. Tym bardziej, że jak wykazują niektóre prace lokalna aktywność COX-2 w mitochondriach może zostać powiązana z ryzykiem wystąpienia oporności na aktywację szlaków apoptotycznych (np. praca Liou i wsp. *Exp Cell Res*, 2005, 306, 75). W rozdziale 3.4. przedstawiono obszerną dyskusję ilustrującą ten problem w przypadku pochodnej o amfifilowym charakterze. Być może przeprowadzenie analogicznego eksperymentu redystrybucji dla pochodnej paracetamolowej dało by pełniejszy obraz omawianych zjawisk. Zwłaszcza w świetle przedstawionych różnic dla odmiennych komórek.

Niezależnie jednak od możliwych mechanizmów badane w pracy pochodne bakteriochloryny wpływają na spadek poziomu prostaglandyny PGE₂ w traktowanych komórkach co w połączeniu z innymi opisanymi efektami może prowadzić do specyficznej aktywacji układu odpornościowego. Eksperymenty określające długotrwałą odpowiedź immunologiczną dobrze to potwierdzają, stanowiąc jednocześnie szczególnie wartościowy punkt do dalszych badań. W pełni zgadzam się z przedstawionym przez autorkę we wnioskach postulatem o potencjale fotoimmunoterapii.



Załączony do pracy suplement dobrze opisuje przeprowadzone eksperymenty. Z pominięciem już przedstawionych uwag, ta część pracy jest w pełni akceptowalna. Myślę, że pewnym ukłonem w stronę czytelników byłoby zaznaczenie w rozdziale omówienie wyników, do których konkretnie punktów w suplemencie odwołuje się autorka przedstawiając eksperymenty. W całej części III bowiem niełatwo znaleźć bardziej szczegółowe informacje (na przykład o zastosowanych stężeniach) co zmusza do przeszukiwania całego suplementu.

Praca robi wrażenie przejrzystej i logicznej pomimo rozbudowania. Robiłaby też wrażenie dobrze napisanej gdyby nie liczne błędy edytorskie i stylistyczne. Można odnieść wrażenie, że ostatnie poprawki nanoszone były w ostatniej chwili. Przykładowo w pracy odnaleźć można wszystkie bodaj możliwe wariacje skrótu „między innymi”. Warto przypomnieć, że poprawna forma to m.in. a jeśli po skrócie wymieniane są co najmniej dwa niepowiązane elementy należy dodać jeszcze dwukropek. Na stronie 31 odnaleźć można zdanie „Do cech, które powinny charakteryzować się idealne fotosensybilizatory...”. Na stronie 33 natomiast podano błędne jednostki w omówieniu zdolności penetracji światła (sugerując że światło niebieskie penetruje na 0,2cm, a w przypadku światła czerwonego 1,8 mm) oraz przy stężeniu generowanych ROS (mm zamiast mM). Na stronie 35 Niezbyt szczęśliwie skonstruowane zdanie sugeruje że tlen singletowy lub rodnik hydroksylowy generują fotouszkodzenia. W przypadku tych cząsteczek można mówić raczej o uszkodzeniach redox. Podobnie jak rodnik nie generuje fotodegradacji bakteriochloryny. Podobna sytuacja na stronie 37: mała zdolność penetracji światła to nie jest cecha fotouczulacza. Cechą fotouczulacza jest absorbcja światła w niekorzystnym zakresie. Według informacji na stronie 38 w przypadku Padeliporfinu stosuje się „naświetlanie trwające nieprzekraczające 20-25 min”. Na stronie 47 „nowotworowych, niż sam nowotwór w sposób konstytutywny” - prawdopodobnie powinno być „samym wpływem konstytutywnym nowotworu”. Na stronie 57 pokonały mnie cytokiny, które w wielu przypadkach mogą działać antagonistycznie wykazując efekty synergistyczne. Samo określenie synergia też bywa stosowane przez autorkę niekiedy na wyrost, tak jak na stronie 84 (synergistyczne działanie fragmentów fotouczulaczy). Na stronie 134 mamy rozpuszczalniki polarne jak EtOH oraz polarne jak DMSO. Rysunek 75 byłby bardziej czytelny w postaci słupkowej. W języku Polskim liczby dziesiętne zapisujemy po przecinku. Wprawdzie w tekstach naukowych często spotyka się stosowanie kropki, jednakże błędy innych to marna pociecha a przy braku spójności tym bardziej warto położyć nacisk na poprawność.



Obowiązkiem recenzenta jest podkreślić zalety pracy, jej zorientowanie w aktualnych naukowych trendach, ocenić poziom wiedzy i zaangażowania doktoranta również poprzez dostrzeżone błędy. W przypadku przedstawionej mi do recenzji rozprawy te ostatnie dotyczą jedynie edytorskiej części pracy, nie mam natomiast zarzutów merytorycznych. Pod tym względem rozprawa doktorska Pani mgr Barbary Pucelik stanowi spójne dzieło o znacznej wartości naukowej. Cel pracy jest ambitny a metody wybrane do jego osiągnięcia wszechstronne i dobrze ugruntowane w nowoczesnej nauce. Praca łączy wyniki uzyskiwane we współpracy z interdyscyplinarnymi grupami. Dzięki takiemu podejściu autorka zyskała szeroką perspektywę na badaną dziedzinę. Właśnie to szerokie, interdyscyplinarne podejście charakteryzuje dziś chemię medyczną i farmakologię, a więc te dziedziny, w których praca chemika podporządkowana jest konkretnym wymaganiom stawianym często na nie-chemicznym polu. Doktorantka dobrze wywiązała się ze swego zadania, wykazując się właściwą wiedzą, samodzielnością i zaangażowaniem a uzyskane przez nią wyniki mogą przyczynić się do rozwoju nowoczesnej terapii fotodynamicznej oraz opracowania nowych skutecznych leków.

W związku z powyższym stwierdzam że doktorantka jest w pełni ukształtowanym młodym naukowcem o bogatym doświadczeniu i właściwym podejściu do nauki a przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia warunki określone w art. 13 ust1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2016r. poz. 882 i 1311). Dlatego też stawiam wniosek Wysokiej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Barbary Pucelik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysoki poziom prezentowanych badań, ich znaczny potencjał rozwojowy oraz aplikacyjny a także imponujący w tak młodym wieku dorobek naukowy wnioskuję również o przyznanie Pani mgr Barbarze Pucelik wyróżnienia.

dr hab. Robert Musioł