

Prof. n. tech. dr hab. n. fiz. inż. lek. med. Halina Podbielska
Kierownik Katedry Inżynierii Biomedycznej
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
Politechnika Wroclawska
50-370 Wrocław
Wybrzeże Wyspiańskiego 27

Recenzja rozprawy doktorskiej

Wpływ terapii fotodynamicznej na sekrecję wybranych czynników wzrostu wydzielanych przez komórki raka jelita grubego w mikrośrodku niedotlenienia

Autor rozprawy: lek. Katarzyna Wawrzyniec
Promotor: dr hab. n. med. Aleksandra Kawczyk-Krupka

Recenzję rozprawy doktorskiej sporządzono w związku z uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

W ostatnich latach coraz większą wagę przykładają się do medycyny opartej na predykcji, prewencji i spersonalizowanym podejściu do pacjenta. Towarzyszy temu rozwój małoinwazyjnych procedur terapeutycznych i diagnostycznych. Szczególnie widoczne jest to we współczesnej onkologii, wciąż poszukującej bardziej zindywidualizowanych form terapii. Wiele prowadzonych obecnie na świecie prac poświęconych jest badaniom nad liniami komórek nowotworowych, w różnych środowiskach, tak aby poznać mechanizmy ich wzrostu i czynniki nań wpływające. Jednym z najczęstszych nowotworów jest rak jelita grubego. Recenzowana rozprawa doktorska dotyczy właśnie badań nad komórkami tego typu nowotworu.

Coraz większą rolę we współczesnej inżynierii biomedycznej i badaniach biomedycznych; dotyczących zarówno diagnostyki, jak i terapii odgrywają metody optyczne bądź to optoelektroniczne. Stanowią one przedmiot badań podstawowych, jak i klinicznych. Wyjaśnienie przyczyn wielu schorzeń oraz zrozumienie zjawisk, zachodzących w organizmach żywych może przyczynić się do wdrożenia lepszych procedur klinicznych, bardziej dokładnych i bardziej pacjentowi przyjaznych. Najlepszym tego przykładem jest medycyna laserowa, której szerokie zastosowania obserwujemy w praktyce, szczególnie w oftalmologii czy dermatologii, a także medycyna fotodynamiczna; PDD i PDT. W naszym kraju również prowadzone są szeroko

zakrojone prace w tej tematyce, a metody fotodynamiczne znalazły już bezpośrednie aplikacje kliniczne (np. w przypadku raków podstawnkomórkowych, przełyku Baretta etc.).

Recenzowana rozprawa Pani Katarzyny Wawrzyniec dotyczy bardzo aktualnego i ważnego aspektu, a mianowicie określenia subletalnych dawek PDT z zastosowaniem jako światłouczulacza kwasu 5-aminolewulinowego ALA. Autorka rozprawy badała wybrane czynniki wzrostu: czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów GM-CSF, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów G-CSF i czynnik wzrostu fibroblastów FGF żywych komórek o różnym stopniu złośliwości w przypadku niedoboru tlenu.

Praca wraz z przypisami i rysunkami liczy 132 strony, z czego 40 stron (pierwszy rozdział – Wstęp) poświęcono opisowi przedmiotu badań (rak jelita grubego – dane epidemiologiczne, wybrane dane na temat aktywności przerzutowej), a także przeglądowi literatury dotyczącej diagnostyki i terapii fotodynamicznej (w tym mechanizmom i skutkom działania). Autorka zaprezentowała też przegląd dotyczący zastosowania PDT w raku jelita grubego, omawiając wyniki badań przedklinicznych *in vitro* i *in vivo*, a także dotychczasowe efekty prób klinicznych. Podkreśliła zasadność uwzględniania w PDT warunków niedotlenienia. Opisała także poszczególne analizowane czynniki wzrostu wydzielane przez komórki raka jelita grubego.

Spis literatury zawiera 148 pozycji, głównie z piśmiennictwa światowego. Praca, zgodnie z wymogami ustawowymi, uzupełniona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim.

W rozdziale 2. Doktorantka przedstawiła cel i założenia pracy. Autorka wyznaczyła sobie cztery ambitne zadania: ocenę fotocytotoksyczności, zbadanie czynników wzrostu GM-CSF, G-CSF i FGF, zbadanie zależności pomiędzy stopniem złośliwości raka jelita grubego a stężeniem tych czynników oraz ocenę różnic w sekrecji w warunkach normoksji i hipoksji.

Rozdział 3. poświęcony jest opisowi materiału badawczego i wyjaśnieniu stosowanych metod badawczych. Badania stężenia czynników wzrostu: czynnika wzrostu fibroblastów (FGF) oraz dwóch hematopoetycznych czynników wzrostu, tj. czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF) i czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) przeprowadzono na supernatantach pozyskanych z hodowli komórkowych. Do badań na liniach komórkowych wykorzystano komórki nowotworowe o

złośliwości stopnia B (SW480); złośliwość miejscowa, przekroczenie ściany jelita oraz komórki nowotworu o klasie złośliwości C (SW620), pochodzące z przerzutu do węzła chłonnego. Badano trzy różne stężenia ALA. Warunki hipoksji zapewniono za pomocą chlorku kobaltu. Testowano różne dawki energetyczne zastosowanego promieniowania elektromagnetycznego. Żywotność komórek oceniano testem LDH i metodą MTT. Do oceny apoptozy zastosowano mikroskop fluorescencyjny. Doktorantka wyjaśniła też zastosowane testy statystyczne.

Rozdział 4 poświęcony jest omówieniu uzyskanych wyników eksperymentu. W większości wyniki przedstawiono w formie tabelarycznej i diagramów, na których zilustrowano średnie, odchylenia standardowe i poziomy istotności statystycznej. Różnice badano testem U Manna-Whitneya.

Część eksperymentalna została bardzo starannie zaplanowana i rzetelnie zrealizowana. W pierwszym etapie eksperymentu doktorantka określiła dawki ALA-PDT, które nie wywoływały bezpośredniego efektu cytotoksycznego. Posłużyła się w tym celu testem żywotności komórek MTT i cytotoksyczności LDH, w których oceniła wpływ dawek ALA o stężeniach 500 μM , 1000 μM lub 1500 μM . Do naświetlania wybrała promieniowanie o powierzchniowej gęstości energii (PGE) wynoszącej 10 J/cm^2 , 30 J/cm^2 lub 60 J/cm^2 . Jako dawki subletalne ALA-PDT wybrała następujące parametry: stężenie prekursora fotouczulacza 1000 μM i PGE 10 J/cm^2 . Dodatkowo, analizując uzyskane wyniki obydwu testów, autorka zauważyła, że komórki linii SW620 wykazały większą wrażliwość względem wyższych – cytotoksycznych dawek ALA-PDT w porównaniu do linii SW480, zarówno w środowisku normoksji, jak i w warunkach niedotlenienia. Brak efektu cytotoksycznego po zaaplikowaniu tej dawki ALA-PDT dodatkowo potwierdziła, oceniając liczbę komórek apoptycznych w mikroskopie fluorescencyjnym. Również ta analiza ujawniła wyższą wrażliwość linii SW620 niż SW480, wyraźniej zauważalną w środowisku niedotlenienia.

Następnie, Doktorantka wpływ ALA-PDT na aktywność wydzielniczą komórek raka jelita grubego. Aktywność sekrecyjną określała, mierząc stężenie czynników progresji raka wydzielanych przez komórki nowotworowe immunoenzymatyczną metodą Bio-Plex.

Doktorantka wykazała, że w przypadku każdego analizowanego czynnika wydzielanego przez komórki linii SW620 wyniki są istotne statystycznie. W przypadku FGF i G-CSF ALA-PDT stwierdziła nieistotny wpływ oddziaływania fotodynamicznego na sekrecję przez komórki linii SW480, bez względu na obecność w medium hodowlanym chlorku kobaltu (II). Odmienne wyniki Autorka rozprawy odnotowała w supernatantach pozyskanych z hodowli linii SW620, w których subletalne dawki ALA-PDT spowodowały spadek stężenia FGF w warunkach normoksji

(o 30%) i niedotlenienia (o 31%). Ponadto stwierdziła, że komórki linii o wyższym potencjale metastatycznym SW620 w stanie wyjściowym są bardziej aktywne w porównaniu do linii SW480 (wyższa sekrecja FGF i G-CSF). W tym przypadku ALA-PDT w dawkach subletalnych spowodowała obniżenie wydzielania G-CSF o 43% w normoksji i odpowiednio o 54% w hipoksji przez komórki linii SW620 w porównaniu do hodowli natywnych tej linii.

Doktorantka, analizując stężenia GM-CSF odnotowała istotny wzrost wydzielania tej cytokiny przez komórki obydwu linii raka jelita grubego po zastosowaniu subletalnych dawek ALA-PDT, bez względu na obecność lub brak chlorku kobaltu w medium hodowlanym. Odnotowała aż pięciokrotny wzrost sekrecji GM-CSF przez komórki linii SW480 i dwukrotny przez komórki linii SW620 w stosunku do hodowli kontrolnych.

Nie stwierdziła natomiast istotnych statystycznie różnic pomiędzy wpływem subletalnych dawek ALA-PDT na aktywność sekrecyjną badanych czynników wzrostu przez komórki raka jelita.

Rozdział piąty rozprawy poświęcony jest dyskusji. Omówienie uzyskanych wyników przeprowadzono, odwołując się do aktualnej wiedzy z zakresu terapii fotodynamicznej, immunoterapii i terapii raka jelita grubego. Trzeba podkreślić, że Doktorantce udało się podkreślić możliwość wykorzystania wyników pracy w spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej i immunoterapii. Uzyskane wyniki, potwierdzające istotny wpływ terapii PDT w subletalnych dawkach na aktywność sekrecyjną komórek raka jelita grubego, pozwalają przypuszczać, że za pomocą PDT można oddziaływać na aktywność układu odpornościowego, modulując wydzielanie czynników wzrostu. Ten efekt immunomodulacyjny może odpowiadać za utrzymanie obserwowanych w badaniach klinicznych korzystnych efektów działania PDT w późniejszych etapach reakcji fotodynamicznej, kiedy stężenie tlenu w środowisku może być czynnikiem w znacznym stopniu ograniczającym efekt cytotoksyczny PDT.

Wykazany brak różnic w aktywności wydzielniczej komórek raka jelita grubego w przy normoksji i niedotlenieniu stanowi niezwykle istotne spostrzeżenie, które pozwala inaczej spojrzeć na mechanizmy działania PDT i nie rezygnować z tej metody, postrzeganej dotychczas jako wyjątkowo zależnej od stężeniu tlenu.

Ponadto, bardzo istotnym walorem pracy jest wykazanie, że ALA-PDT nie hamuje odpowiedzi układu immunologicznego, jak to często ma miejsce w przypadku standardowych terapii onkologicznych. Autorka podkreśliła zalety PDT jakimi są mała inwazyjność i brak wpływu mutagennego, obserwowany jest efekt immunomodulacyjny.

Rozdział szósty zawiera podsumowanie wyciągniętych wniosków.

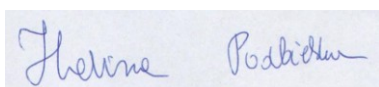
Rozprawa jest starannie zredagowana i na ogół napisana poprawnym językiem. Pewnym mankamentem jest nadużywanie słowa „dla”, zamiast bardziej poprawnego „do”. Również bardziej poprawne byłoby sformułowanie „komórki wydzielają badane czynniki w wyższych stężeniach” niż „komórki wydzielają wyższe stężenia”.

W zasadzie nie stwierdzono błędów merytorycznych czy usterek w opisie rysunków i tabel. Można by było natomiast w części poświęconej dyskusji odnieść się bardziej do parametrów klinicznych stosowanych obecnie terapii ALA-PDT. Czy w świetle otrzymanych wyników, Doktorantka sugerowałaby zmiany tych parametrów; jeżeli tak, to jakie?.

Rozprawa zawiera bogaty spis literatury, niestety nie umieszczono tam prac Doktorantki. Na pewno odpowiednia Komisja do spraw przewodów doktorskich dopilnowała spełnienia wymogów formalnych. Niemniej jednak, jako Recenzent zwróciłam się o nadesłanie spisu publikacji, których Doktorantka jest współautorem. Z tych informacji wynika, że Doktorantka ma na swoim koncie siedem współautorskich publikacji, w tym jedną w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej i to bezpośrednio związaną z pracą dokorską.

Recenzowana rozprawa w całości stanowi bardzo wartościową pozycję o dużych walorach aplikacyjnych i świadczy o rzetelnym podejściu Doktorantki, a także inwencji i opanowaniu sztuki planowania i wykonania badań naukowych. Należy też zaznaczyć, że badania Autorki powinny być kontynuowane, gdyż zastosowanie podejścia fotodynamicznego może być pomocne w spersonalizowanej terapii, co byłoby niewątpliwie dużym osiągnięciem.

Mając na uwadze osiągnięte wyniki i ogólną wartość pracy oraz obowiązujące przepisy o stopniach i tytułach naukowych, wnoszę o dopuszczenie Pani Katarzyny Wawrzyniec do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na ważkość otrzymanych rezultatów i częściowe ich opublikowanie wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy, w przypadku pozytywnego przebiegu obrony.



Prof. n. tech. dr hab. n. fiz. inż. lek. med. Halina Podbielska