

Katowice, 2015-03-16

Prof. dr hab. Alicja Ratuszna

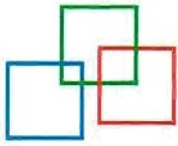
Recenzja pracy doktorskiej pani Katarzyny Wawrzyniec, lekarza

pt. ***Wpływ terapii fotodynamicznej na sekrecję wybranych czynników wzrostu wydzielanych przez komórki raka jelita grubego w mikrośrodowisku niedotlenienia.***

*Przedstawiona do recenzji praca doktorska wykonana została w Katedrze i Oddziale Klinicznym Chorób Wewnętrznych, Angiologii i Medycyny Fizykalnej, na Wydziale Lekarskim z Oddziałem Lekarsko – Dentystycznym, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem dr hab. n. med. Aleksandry Kawczyk – Krupki, z zespołu prof. dr hab. Aleksandra Sieronia.*

*We współczesnym podejściu do onkologii jest, jak pisze Doktorantka we wstępie, nie tylko terapia przeciwnowotworowa, stosowana poprzez chirurgię, chemio-, radio-, lasero- czy immunoterapię, lecz także zapobieganie progresji nowotworu, poprzez określenie potencjału złośliwości komórek nowotworowych, ich zdolności do wzrostu, angiogenezy i metastazji, od sekrecji cytokin i chemokin oraz czynników odpowiedzialnych za postęp choroby.*

*W recenzowanej pracy przedstawiono wyniki badań *in vitro* na sekrecję wybranych czynników wzrostu wydzielanych przez komórki gruczolakoraka jelita grubego. Wybór komórek raka jelita grubego podyktowany został tym, że złośliwy nowotwór jelita grubego jest bardzo częstą przyczyną zgonów, a odsetek pięcioletnich przeżyć chorych na ten nowotwór wynosi w Polsce 50 procent. Ma on wysoki potencjał przerzutowy, co związane jest z sekrecją przez komórki cytokin i chemokin, w tym czynników wzrostu. Stąd istotnym jest wybór odpowiedniej terapii, która będzie opierała się na molekularnych i immunologicznych szlakach związanych z progresją nowotworów.*



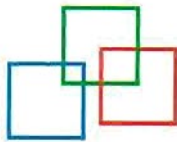
Wydaje się, że taką nieinwazyjną terapią może być terapia fotodynamiczna (PDT), nie w pełni doceniana przez onkologów, która ma tę zaletę, że selektywnie niszczy komórki nowotworowe, poprzez takie mechanizmy jak: bezpośredni (cytotoksyczny), pośredni (naczyniowy) i immunologiczny.

W pracy doktorskiej przeprowadzona została analiza wpływu terapii fotodynamicznej na sekrecję trzech wybranych czynników wzrostu wydzielanych przez komórki gruczolakoraka jelita grubego w zależności od obecności lub braku w środowisku chlorku kobaltu ( $\text{CoCl}_2$ ). Jest to praca eksperymentalna wykonana w warunkach *in vitro*. Doświadczenia przeprowadzono na komórkach gruczolakoraka jelita grubego dwóch linii, różniących się potencjałem złośliwości. Pierwszą linią komórkową była linia o miejscowej złośliwości - SW480, a drugą linią charakteryzującą się wyższym potencjałem przerzutowania – linia SW620.

Rozprawa podzielona została na osiem rozdziałów: Wstęp, Cel i założenia pracy, Materiał i metodyka, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo, Streszczenie, napisanych w przejrzysty i zrozumiały sposób, a jednocześnie poruszających niezbędne zagadnienia związane z tematem pracy.

Pierwszym rozdziałem rozprawy jest „Wstęp” podzielony na siedem podrozdziałów, w którym Autorka w zwięzły i jasny sposób przedstawia uzasadnienie wyboru i istotność problemu poruszanego w pracy. W podrozdziale opisującym raka jelita grubego pokrótce przedstawiono sytuację epidemiologiczną związaną z tym nowotworem, zwrócono uwagę na jego wysoki potencjał przerzutowania, częste nawroty i rokowanie. Autorka płynnie przeszła z kwestii ograniczeń konwencjonalnie stosowanych metod terapeutycznych do możliwości ominięcia ich dzięki zastosowaniu terapii fotodynamicznej. Jako czynnik, który wpływa na progresję nowotworu, mogący ograniczać efekt PDT a jednocześnie odzwierciedla środowisko rozwijające się w tkance nowotworowej podczas jej wzrostu i przebiegu PDT *in vivo*, wybrano niedotlenienie.

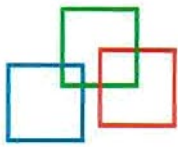
W kolejnym podrozdziale skrupulatnie opisano podstawy i mechanizmy terapii fotodynamicznej ze szczególnym uwzględnieniem jej efektu immunologicznego. Następnie opisano charakterystykę fotobiofizyczną kwasu 5-aminolewulinowy (ALA), który jest prekursorem fotouczulacza - protoporfiryny IX, zastosowanym w pracy. Omówiono rolę PDT w leczeniu nowotworów raka jelita grubego, progresji nowotworu a następnie drobiazgowo wpływ niedotlenienia zarówno



na poszczególne procesy odpowiedzialne za wzrost nowotworu jak i na efekt PDT z uwzględnieniem poziomu tkankowego, komórkowego i molekularnego. Wyjaśniono wybór chlorku kobaltu jako czynnika odzwierciedlającego warunki niedotlenienia w doświadczeniach *in vitro*. Szczególny nacisk położono na konieczność przeprowadzenia analizy wpływu warunków odpowiadających niedotlenieniu ( $\text{CoCl}_2$ ) na efekt immunomodulacyjny PDT, a nie jak w dotychczas opisywanych pracach na skutek cytotoksyczny, który w środowisku niedotlenienia jest hamowany. W ostatnim podrozdziale „Wstępu” scharakteryzowano badane trzy czynniki wzrostu: czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF) oraz czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF). Szczegółowy opis powyższych rozdziałów jest jak najbardziej uzasadniony, gdy uwzględnimy charakter i tematykę poruszaną w pracy, co pozwala zrozumieć poszczególne etapy prowadzonych eksperymentów.

W rozdziale „Cele i założenia” przedstawiono próby oceny w warunkach zbliżonych do modelu *in vivo* (niedotlenienie) wpływu terapii fotodynamicznej na aktywność sekrecyjną komórek raka jelita grubego. Aby zrealizować powyższy cel oceniono efekt cytotoksyczny i wybrano subletalne dawki ALA-PDT do doświadczenia głównego. Następnie oznaczono stężenia czynników wzrostu (FGF, G-CSF, GM-CSF) wydzielanych przez obydwie linie raka jelita grubego (SW480 i SW620) pod wpływem subletalnych dawek ALA-PDT i przeprowadzono analizę różnic w sekrecji badanych cytokin w zależności od stopnia złośliwości komórek raka jelita grubego i od obecności chlorku kobaltu.

W kolejnym rozdziale rozprawy wymieniono wykorzystaną w eksperymencie aparaturę, odczynniki, scharakteryzowano badane linie komórkowe i opisano proces przygotowania hodowli komórkowych do wykonania doświadczeń *in vitro*. W następnej części pracy Autorka opisała szczegóły przeprowadzenia terapii fotodynamicznej, czyli addycji kwasu 5-aminolewulinowego, chlorku kobaltu i naświetlania komórek. Przedstawiono podstawy teoretyczne zastosowanych testów z pomocą których oceniono wpływ ALA-PDT i  $\text{CoCl}_2$  na żywotność komórek: cytotoksyczności LDH oraz żywotności MTT. Na podstawie wyników powyższych badań wybrano parametry ALA-PDT subletalne, dla których brak cytotoksyczności dodatkowo oceniono i potwierdzono analizując apoptozę metodą mikroskopii fluorescencyjnej. Następnie szczegółowo opisano immunoenzymatyczną metodę Bio-Plex wykorzystaną do oznaczeń badanych w doświadczeniu głównych czynników wzrostu.

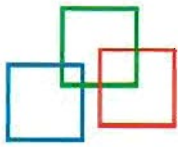


*Uzyskane wyniki badań przedstawiono na wykresach słupkowych i tabelarycznie jako średnie i odchylenia standardowe z uwzględnieniem poziomu istotności statystycznej.*

*W rozdziale „Wyniki” zaprezentowano i omówiono wyniki żywotności komórek i apoptozy oddzielnie dla linii SW480 i SW620 w normoksji i środowisku odpowiadającym niedotlenieniu z chlorkiem kobaltu. W następnej kolejności zamieszczono wyniki uzyskanych stężeń analizowanych czynników wzrostu w supernatantach poszczególnych hodowli komórkowych linii SW480 i SW620: natywnych, naświetlanych, poddanych działaniu fotouczulacza, terapii fotodynamicznej w środowisku z i bez chlorku kobaltu.*

*W obszernej „Dyskusji” Autorka umiejętnie przedstawiła słuszność wyboru poszczególnych etapów doświadczenia, których celem była analiz wpływu immunomodulacyjnego PDT na komórki rakowe w środowisku odzwierciedlającym niedotlenienie. Kompetentnie uzasadniła wybór PDT jako potencjalnej metody leczenia raka jelita grubego, kwasu 5-aminolewulinowego jako prekursora fotouczulacza, konieczność rozszerzenia badań o fotodynamikę w onkologii, jej wpływu na układ odpornościowy i aktywność sekrecyjną komórek rakowych oraz ważność uwzględnienia, w aspekcie terapii fotodynamicznej raka jelita grubego, parametru jakim jest niedotlenienie. Następnie omówiła uzyskane wyniki w kontekście wyżej wymienionych zagadnień i spróbowała zinterpretować rezultaty z poziomu mechanizmów komórkowych PDT i możliwość odniesienia i pełniejszego ich wykorzystania w spersonalizowanej terapii raka jelita grubego. Autorka po raz pierwszy poruszyła temat wpływu ALA-PDT na sekrecję czynników wzrostu przez komórki gruczolaka jelita grubego dwóch linii różniących się potencjałem złośliwości z uwzględnieniem środowiska niedotlenienia. Otóż ocena żywotności komórek linii SW480 i SW620 wykazała wzrost odsetka komórek martwych proporcjonalnie do zaaplikowanej dawki energii i stężenia ALA. Dawka 1000  $\mu\text{M}$  ALA i naświetlanie 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  nie spowodowało istotnego dla oceny aktywności sekrecyjnej komórek obniżenia ich żywotności bez istotnych statystycznie różnic w zależności od obecności w środowisku reakcji chlorku kobaltu.*

*Analiza stężeń czynników wzrostu wykazała, że komórki gruczolakoraka jelita grubego o wysokim potencjale złośliwości (SW620) wydzielają aktywniej FGF i G-CSF w porównaniu do komórek linii łagodniejszej (SW480). Odnotowano, że ALA-PDT w dawkach subletalnych nie wpływała na sekrecję tych czynników przez komórki SW480, ani w obecności lub bez chlorku kobaltu, w przeciwień-*



stwie do wyraźnego obniżenia wydzielania FGF i G-CSF po ALA-PDT przez komórki SW620 zarówno w normoksji jak i w środowisku z chlorkiem kobaltu.

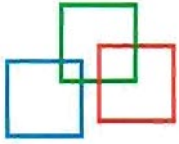
Odmienne wyniki uzyskano dla GM-CSF, gdzie zaobserwowano, że w warunkach podstawowych obie linie komórkowe wydzielają ten czynnik na porównywalnym poziomie. Obie linie komórkowe odpowiedziały wzrostem sekrecji GM-CSF po zaaplikowaniu subletalnych dawek ALA-PDT, lecz komórki o niższym potencjale złośliwości wydzielaty go aż pięciokrotnie więcej w porównaniu do warunków podstawowych, podczas gdy wzrost wydzielania odnotowany w supernatantach linii SW620 był dwukrotnie wyższy bez względu na obecność chlorku kobaltu w środowisku reakcji.

*Podsumowanie:*

Przedstawione w recenzowanej pracy wyniki wskazują, że efekt immunologiczny PDT nie jest tak zależny od stężenia tlenu jak jej wpływ cytotoksyczny. Rezultat ten tłumaczy rozbieżności między dotychczasowymi analizami doświadczeń *in vitro* lub *in vivo* oceniającymi skuteczność PDT tylko na podstawie braku efektu cytotoksycznego w hipoksji, a utrzymywaniem działania PDT w późniejszych etapach terapii, gdy w tkance już rozwija się hipoksja.

Uzyskane obniżenia stężeń czynników odpowiedzialnych za angiogenezę i progresję nowotworu (FGF, G-CSF), a zwiększenie w analizowanym materiale sekrecji czynnika stymulującego obronę przeciwnowotworową komórek układu odpornościowego (GM-CSF) pod wpływem ALA-PDT bez względu na stężenie tlenu w środowisku reakcji *in vitro*, są dowodem przemawiającym na korzyść i wyjaśniającym jeden z mechanizmów działania PDT. Przedstawiony w niniejszej pracy, porównywany w środowisku normoksji jak i chemicznej mimikry niedotlenia, wpływ ALA-PDT na aktywność sekrecyjną komórek raka jelita grubego sugeruje brak ograniczenia jej skuteczności niedoborem tlenu w mikrośrodowisku.

Podjęty przez panią Katarzynę Wawrzyniec temat, jak i sposób prezentacji oraz omówienia wyników mają wysoką wartość merytoryczną. Przedstawienie wyników badań i umiejętna ich interpretacja świadczą o dobrym opanowaniu teorii z zakresu terapii fotodynamicznej, co potwierdza współautorstwo pani Katarzyny Wawrzyniec w kilku pracach tematycznie powiązanych z analizowanym w rozprawie zagadnieniem, oraz o jej odpowiednim warsztacie doświadczalnym. Codzienna praca Autorki w warunkach klinicznych umożliwiła wyciągnięcie ostrożnych wniosków i możliwość



odniesienia uzyskanych w warunkach *in vitro* wyników, dla klinicznego wykorzystania oznaczeń stężeń FGF i G-CSF w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego, celem bardziej precyzyjnej stratyfikacji ryzyka szybkiej progresji i zaawansowania choroby oraz złośliwości zmiany ogniskowej. Uzyskane przez Autorkę dysertacji wyniki mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmu immunomodulacyjnego PDT i potwierdzenia skuteczności jego działania, tak wielokrotnie kwestionowanego.

*Konkluzja:*

*Recenzowana rozprawa doktorska pani Katarzyny Wawrzyniec, z tak podjętą tematyką jak i sposobem prezentacji uzyskanych wyników i ich interpretacją spełnia wszelkie wymagania stawiane tego typu pracom. Doktorantka pokazała, że posiada odpowiednią wiedzę i bardzo dobrze oprowadzony warsztat badawczy. Dlatego z pełnym przeświadczeniem stwierdzam, że rozprawa spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określone w art.13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r, nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję o dopuszczenie pani Katarzyny Wawrzyniec do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o jej wyróżnienie, z uwagi na wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wysoką wartość naukową i istotny wkład uzyskanych wyników w rozwój terapii fotodynamicznej, jak i możliwość ich praktycznego zastosowania w przyszłości w terapii pacjentów onkologicznych.*

Alicja Ratuszna