

Recenzja pracy doktorskiej Beaty Mossakowskiej pt:

„Mechanizmy molekularne przyczyniające się do powstawania oporności na terapii fotodynamiczną z użyciem kwasu 5 -aminolewulinowego w nowotworach sromu. Możliwe cele terapeutyczne

1. Ogólna charakterystyka pracy

Metoda fotodynamiczna z wykorzystaniem kwasu 5- aminolewulinowego (ALA) w Polsce jest szeroko stosowana w klinikach, głównie dermatologicznych i nielicznych ginekologicznych, od dwudziestu lat. Odznacza się wieloma zaletami, jest nieinwazyjna, można ją stosować do dużych powierzchni zmian, charakteryzuje się wysokim stopniem wyleczeń chorób nie nowotworowych i nowotworowych, głównie super powierzchownych i w początkowej fazie zmian chorobowych.

Głównym ograniczeniem metody jest zbyt niska głębokość penetracji kremów i żeli zawierających ALA, ograniczona do nabłonka i naskórka. Istnieją schorzenia (np. choroba Bowena, rak podstawnkomórkowy, rogowacenia słonecznego, stany przedrakowe VIN) o bardzo wysokim stopniem wyleczalności dochodzącym do 80-90%. Zdecydowana większość nieudanych przypadków leczenia fotodynamicznego spowodowana jest brakiem kontroli poziomu biosyntezowanej protoporfiryny IX po aplikacji ALA i przyjmowanym założeniem, że standardowy czas, po który następuje naświetlanie jest podobny dla wszystkich pacjentów i wynosi około 3-4 godziny. Występuje jednak silne zróżnicowanie indywidualnych szybkości biosyntezy u pacjentów, nawet z tą samą jednostką chorobową i w wielu przypadkach maksymalny poziom PPIX osiągany jest już po 2 godzinach, a w niektórych dopiero po 6-8 po aplikacji ALA. Drugą przyczyną nieudanych eksperymentów jest naświetlanie przy nieodpowiednich parametrach gęstości mocy, najczęściej zbyt wysokich, przekraczających 50 mW/cm². Przy zbyt szybkim prowadzeniu procesu fotoutleniania dochodzi do szybkiego wyczerpania tlenu w komórkach i następuje degradacja PPIX, tzw. fotowysbielenie PPIX.

Istnieje jednak około 10% przypadków, że nawet w chorobach łatwo uleczalnych metodą PDT, przy optymalnych warunkach naświetlania, przy wysokim poziomie PPIX nie obserwuje się efektu fotoutleniania komórek lub ten efekt jest słaby i najczęściej trzeba wielokrotnie powtarzać procedurę. Ponadto część komórek może przeżyć terapię i zmienić swój fenotyp, prowadząc do pojawienia się oporności. Problemowi mechanizmów nabywania oporności poświęcona jest rozprawa doktorska pani mgr Beaty Mossakowskiej pt: „Mechanizmy molekularne przyczyniające się do powstania oporności na terapię

fotodynamiczną z użyciem kwasu 5-aminolewulinowego w nowotworach sromu. Możliwe cele terapeutyczne.”

Tematyka rozprawy jest więc wciąż aktualna i ważna, szczególnie, że badania nad mechanizmami oporności w raku sromu są słabo opisane. Zamierzeniem pracy było poszerzenie tej wiedzy o mechanizmach nabywania oporności na terapię fotodynamiczną i wykorzystanie jej w poszukiwaniu metod nad uwrażliwianiem opornych komórek na leczenie. W tym celu doktorantka wyizolowała z linii komórek ludzkiego sromu A-431 i CAL-39 linie odporne a następnie scharakteryzowała je pod kątem zmian nabytych wraz z wrażliwością. Osiągnęła to poprzez kolejnych kilka sesji naświetleniowych z coraz większą gęstością mocy komórek, które przeżyły naświetlanie w pierwszej i kolejnych sesjach. Postawiona była więc w domyśle udowodniona doświadczalnie hipoteza, że można w ten sposób otrzymać komórki odporne na leczenie PDT.

2. Szczegółowy opis osiągniętych wyników

Uzyskane wyniki w pracy wskazują, że oporność na PDT w komórkach sromu może być skutkiem obniżonej akumulacji fotouczulacza, zdolnością niwelowania reaktywnych form tlenu a także zmian w cytoszkielecie związanych ze zwiększoną zdolnością. Wykazano, że mniejsza akumulacja PPIX w komórkach opornych linii A-431 może wynikać ze zwiększonej szybkości syntezy hemu a w komórkach CAL-39 może być wynikiem wolniejszego tempa syntezy PPIX. Komórki odporne A-431 miały też obniżone zawartości reaktywnych form tlenu, co mogło być związane ze zwiększoną ilością nieenzymatycznych antyoksydantów. Obie linie komórkowe wykazały też liczne zmiany w cytoszkielecie obniżające podatność na uszkodzenia oksydacyjne. Obie linie po procedurze PDT wykazały wzrost aktywności enzymu APE1, który uczestniczy w naprawie przez wycinanie zasad i może być niezbędny do naprawy DNA po sesjach PD. Doktorantka wykazała w badaniach, że hamowanie aktywności APE1 skutecznie uwrażliwia komórki na działanie PDT.

Rozprawa doktorska licząca 160 stron podzielona została klasycznie na wstęp, założenia i cele pracy, materiały i metody oraz dyskusję i podsumowanie. W części teoretycznej przedstawiono wyczerpująco zasady działania metody PDT, mechanizmy prowadzące do śmierci komórek, efekty na naczynia guza i układ immunologiczny, uszkodzenia DNA i zmiany towarzyszące nabyciu oporności. Wiedza oparta jest o bogatą, aktualną literaturę liczącą 213 pozycji. Doktorantka bardzo solidnie zebrała odpowiedni materiał z zakresu tematyki rozprawy.

W części doświadczalnej doktorantka opisała linie i hodowle komórkowe, następnie przedstawiała techniki pomiarowe, które stosowała w pracy. Imponując jest ilość różnorodnych testów i metod pomiarowych. Należą do nich m.in. test przeżywalności w odpowiedzi na PDT, uwrażliwianie komórek opornych z zastosowaniem inhibitora aktywności endonukleazy APE1, test przeżywalności po środkach utleniających. Zastosowała metodę spektrometrii mas do analizy proteomów komórek wrażliwych i opornych na PDT. Praca wymagała rozwiązania takich problemów jak pomiar akumulacji porfiryń w komórkach, sprawdzenie lokalizacji PPIX, porównanie ilości mitochondriów, ocenę stresu oksydacyjnego, ocenę, analizę powstałych po PDT reaktywnych form tlenu, ocenę aktywności endonukleazy. Opisana jest także procedura przeprowadzania naświetlania komórek po akumulacji ALA.

W części prezentujących wyniki przedstawiony jest profil białkowy komórek wrażliwych i opornych na PDT, zmiany w poziomie białek towarzyszące pojawieniu się oporności w linii komórkowej CAL-39 i A-431, analizy cyklu komórkowego, pomiary akumulacji i lokalizacji PPIX, ocena stresu oksydacyjnego, analiza RFT, analiza cytoszkieletu, połączeń adhezyjnych i filamentów pośrednich jądra komórkowego, ocena aktywności APE1 i uwrażliwianie komórek opornych na PDT z zastosowaniem inhibitora APE1.

Dyskusja wyników została podzielona na problematykę związaną z akumulacją PPIX, mitochondriami, RFT, cytoszkieletem, APE1, lokalizacją PPIX i mechanizmami chroniącymi przed śmiercią oraz immunogenną śmiercią komórki. Na podstawie przeprowadzonych badań i analiz doktorantka sformułowała szereg końcowych wniosków dotyczących możliwych przyczyn pojawienia się oporności, która jest wynikiem wielu zmian współdziałających przed śmiercią komórek. Należą do nich m.in. obniżenie zdolności akumulacji PPIX, niezależne od miejsca lokalizacji, co wynika ze zmian w ilości enzymów szlaku metabolizmu hemu. Do wyhamowania oporności może wpływać zmiany w poziomie oksydantów – askorbinianu i glutationu. Dla niwelowania skutków PDT jest zwiększona aktywność białek szlaku naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA i hamowanie aktywności APE1 zwiększa skuteczność PDT poprzez m.i. wpływ na profil ekspresji genów.

Pracę oceniam bardzo wysoko pod względem merytorycznym jak i poziomu opracowania. Doktorantka musiała zaangażować wiele technik pomiarowych, aby porównać odporne komórki do normalnych, prześledzić poszczególne etapy szlaku biosyntezy PPIX zbadać profile białkowe komórek. Tematyka, której się podjęła jest bardzo skomplikowana, oporność zależy od wielu czynników i przedstawienie jednoznacznych wniosków dotyczących mechanizmów jest niezwykle trudne ze względu na różne możliwości, przykładowo wpływ rodników i ich wzajemnych relacji.

Bardzo starannie przygotowana została część edytorska. Rysunki i wykresy są czytelne i poparte wyjaśnieniami w tekście. Praca jest spójna, bez zbędnych rozszerzeń, napisana dobrym, komunikatywnym językiem. Przeprowadzona została prawidłowa analiza statystyczna otrzymywanych wyników.

Praca ma znaczenie praktyczne, doktorantka udowodniła bowiem, że normalne komórki sromu nie odporne na działanie PDT po kolejnych sesjach naświetlania nabywają oporność. Jest to ważne spostrzeżenie dotyczące warunków prowadzenia eksperymentów *in vivo* w warunkach klinicznych. Powinno się przeprowadzać jak najmniej powtórzeń procedury PDT i przestrzegać indywidualnego podejścia do każdego pacjenta, kontrolując w czasie poziom PPIX.

3. Uwagi szczegółowe

Punktem wyjścia pracy jest wyodrębnienie linii komórek opornych na działanie PDT. Realizowane jest to poprzez kolejne sesje naświetlania komórek coraz większymi gęstościami mocy promieniowania. W pracy zbyt lakonicznie potraktowano opis eksperymentalny tej części. Nie jest podana nazwa aparatury do naświetlania, tylko jedynie LED i wymieniona długość fali, nie podano źródła pochodzenia odczynników, w tym ALA. Nie podano, w jaki sposób osiągana jest zmiana intensywności naświetlania. Brak jest uzasadnienia, dlaczego wybrano jedno, określone stężenie ALA, czy początkową wartość gęstości mocy. Wydaje mi się, że ustalenia parametrów i warunków procesu PDT są bardzo ważne. Dla osób nie uczestniczących w takich eksperymentach bardzo trudno sobie wyobrazić jak przebiegały te doświadczenia. Brak jest informacji, w jakich warunkach tlenowych naświetlano komórki, a obecność tlenu jest krytyczna dla ich fotoutleniania.

W kolejnych cyklach naświetlania PDT doktorantka wymienia kolejne dawki promieniowania. Dawka (J/m^2) jest iloczynem gęstości mocy (natężenia napromienienia) (W/m^2) i czasu naświetlania. Trzeba się domyślać i samemu przeliczać wartości natężenia napromienienia, które jest tutaj najbardziej istotne. Stosowane wartości natężenia ani razu nie są podane. Dawka jest wielkością wtórną.

Brakuje krzywej wzorcowej wyznaczania poziomu ekstrahowanej PPIX metodą fluorescencyjną. Nie wiadomo nic więc o błędach wynikających z pomiaru tak małych stężeń PPIX. Istnieją poza tym metody bezpośredniego określania poziomu porfiryn w czasie, *on line*, bez konieczności ekstrakcji i pozwalające określać optymalny moment naświetlania po aplikacji ALA, czy czas naświetlania komórek, dopóki jest w nich nierozłożona PPIX. Generalnie opis doświadczeń mógłby być obszerniejszy.

Bardzo dyskusyjny jest przedstawiony problem analizy reaktywnych form tlenu (RFT). Na str. 47 zamieszczono opis eksperymentu przy wyznaczaniu RFT. Komórki po wysianiu inkubowano z 0,6mM ALA i dodatkiem odczynników do oznaczania tlenu singletowego lub rodnika hydroksylowego. Następnie te komórki naświetlano i metodą fluorescencyjną oznaczano poziom RFT. W przypadku jednak oznaczania aniorodnika ponadtlenkowego cytaty: *Alternatywnie komórki nietraktowane oraz po PDT inkubowano przez 10min z 5mM MitoSOX w pożywce bez surowicy*. Czyli odczynnik dodawano nie w trakcie PDT lecz po? Jaki to ma sens?

Opisywana jest metodyka oznaczania RFT bez podawania jakiegokolwiek źródła literaturowego. Wyniki analizy RFT przedstawiono na rysunku 39. Maksymalne różnice pomiędzy poziomami RFT przed naświetlaniem po naświetlaniu wynoszą w przypadku tlenu singletowego o ok. 30%, w pozostałych przypadkach są bardzo podobne, i mieszczące się w granicach błędów. Jak to jest możliwe, skoro te poziomy RFT powinny być o rzędy wielkości większe podczas naświetlania. Co oznaczają symbole DAPI na obrazach fluorescencyjnych? W opisie rysunku jest co prawda zdanie: *oraz zestawem filtrów zoptymalizowanych dla DAPI, FITC, TRITIC*, co to oznacza? Problem z oznaczaniem RFT wiąże się z tym, że w trakcie ich powstawania reagują zarówno z odczynnikami specyficznymi dla ich wykrywania jak i komórkami. Jedyną metodą bezwzględnego określenia poziomu tlenu singletowego jest pomiar jego fosforescencji. Wydaje mi się, że dla badań generacji RFT powinny być takie warunki prowadzenia eksperymentu, aby oznaczane ich poziomy były przynajmniej o rząd większe (stężenie ALA, ilość komórek naświetlanych).

Najbardziej kontrowersyjna jest sprawa podobnego poziomu tlenu singletowego w komórkach nietraktowanych, czyli w warunkach fizjologicznych i w trakcie PDT. Istniały wprawdzie sugestie, że tlen singletowy może powstawać w wielu reakcjach metabolicznych a także w wyniku spontanicznej dysmutazy aniorodnika ponadtlenkowego, nie udało się jednak nigdy potwierdzić tego doświadczalnie. Tlen singletowy bez udziału światła może powstawać podczas rozpadu nadtlenu organicznych i nadtlenu wodoru czy podczas peroksydacji lipidów, nie są to jednak fizjologicznie istotne ilości. Trzeba jednak przyznać, że problem wyznaczania RFT w metodzie PDT jest bardzo skomplikowany i trudny i mógłby być oddzielnym tematem pracy doktorskiej.

Niektóre te uwagi omówiłem z doktorantką, która przysłała mi odpowiednie wyjaśnienia i uzupełnienia. Te drobne uwagi nie mają wpływu na ocenę końcową pracy.

Na koniec nasunęła mi się pewna uwaga związana z materiałem biologicznym stosowanym w badaniach na modelu komórkowym. Szkoda, że nie przeanalizowano także

konkretnych przypadków ewidentnej oporności w warunkach *in vivo* z komórki pobranych od pacjentek. Wyjaśnienie przyczyn oporności w konkretnych przypadkach pozwoliłoby na potwierdzenie wielu wniosków z przedstawionej np. powiązanie skuteczności metody z poziomem oksydantów w organizmie.

4. Końcowa ocena rozprawy

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymagania i kryteria ustawy o nadawaniu stopnia doktora i wnoszę o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów nadania stopnia doktora.

