

Kraków, 23.10.2019

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Natalii Masiery pt. „Porphycenes in photodynamic therapy of cancer cells and photodynamic inactivation of bacteria”

Oporność wielolekowa (MDR) jest jedną z głównych przyczyn ograniczonej skuteczności leczenia zarówno chorób nowotworowych jak i infekcji bakteryjnych. W związku z pojawianiem się nowych, trudnych do leczenia szczepów opornych na większość antybiotyków, nieuchronnie zbliżamy się do końca ery antybiotyków. Wzrastająca oporność bakterii uzasadnia zatem intensywne poszukiwania alternatywnych terapii bakteriobójczych, w tym metod zwalczania infekcji wywołanych przez wielolekooporne mikroorganizmy. Obecny stan wiedzy zarówno na temat infekcji bakteryjnych jak i chorób nowotworowych pozwala wnioskować, że do osiągnięcia całkowitego sukcesu terapeutycznego konieczne jest zastosowanie strategii medycznych działających wielokierunkowo, poprzez zróżnicowane mechanizmy molekularne, ukierunkowane na zniszczenie nowotworów i patogenów chorobotwórczych.

Do takich rozwiązań należy omówiona w recenzowanej pracy doktorskiej terapia fotodynamiczna nowotworów (PDT) oraz fotodynamiczna inaktywacja mikroorganizmów (PDI). Czynniki aktywnymi w obu strategiach są reaktywne formy tlenu (ROS), będące produktami fotoindukowanego przeniesienia elektronu lub/i przekazania energii ze wzbudzonego stanu trypletowego cząsteczek fotosensybilizatora na cząsteczkę tlenu w stanie podstawowym. Możliwość kontrolowanego generowania ROS zależy w dużej mierze od właściwości zastosowanych fotosensybilizatorów. Prowadzone są intensywne badania nad nowymi związkami absorbującymi promieniowanie z zakresu widzialnego i/lub bliskiej podczerwieni, charakteryzujących się zwiększoną selektywnością wobec komórek bakteryjnych oraz mikrośrodowiska guzów nowotworowych, efektywnością w generowaniu zarówno tlenu singletowego jak i wolnych rodników oraz dużą skutecznością terapeutyczną.

Tą ważną i aktualną tematyką badawczą zajmowała się mgr Natalia Masiera podczas przygotowania niniejszej rozprawy doktorskiej. Praca powstała w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Waluka. Tematyka badań podjętych przez Doktorantkę jest kontynuacją wieloletnich prac nad właściwościami spektroskopowymi i fotochemicznymi pochodnych porficyenów, czyli nad zagadnieniami, w których Prof. Waluk jest niekwestionowanym autorytetem w środowisku naukowym na świecie. Swoistym novum jest natomiast poszerzenie tej problematyki badawczej o aspekty biologiczne (badania lokalizacji komórkowej porficyenów i mechanizmów śmierci komórkowej wywołanej efektem fotodynamicznym oraz badania mikrobiologiczne).

Przedstawiona do recenzji praca liczy 112 stron i została napisana w języku angielskim, a jej układ nie budzi zastrzeżeń. Składa się z 9 rozdziałów, przy czym dwa ostatnie rozdziały to spis cytowanej literatury (121 pozycji) oraz spis publikacji i osiągnięć związanych bezpośrednio z doktoratem. Praca ma standardowy dla tego typu opracowań format i zawiera odpowiednio: i) wstęp literaturowy; ii) rozdział, w którym Doktorantka definiuje cele badań; iii) materiały i metody; iv) rozdział poświęcony omówieniu



wyników badań oraz ich analizie i dyskusji; v) podsumowanie rozprawy i zwięzłe sformułowane wnioski; vi) propozycje dotyczące przyszłych badań.

Główną koncepcją niniejszej pracy doktorskiej jest ocena wybranych właściwości fotofizycznych i fotochemicznych serii fotosensybilizatorów należących do grupy izomerów porfirynewych zwanych porficenami. Niewątpliwie największą zaletą tych związków jest ich intensywne absorpcja promieniowania z zakresu czerwonego, które przenika przez tkanki znacznie głębiej niż światło niebieskie czy zielone. Porficyeny absorbują światło czerwone ponad dziesięciokrotnie efektywniej niż klasyczne porfiryny. Umożliwia to dotarcie do zmian nowotworowych zlokalizowanych głębiej pod skórą, a tym samym uzyskanie lepszych efektów terapeutycznych. Z kolei wadą porficenów jest duża hydrofobowość, która uniemożliwia ich bezpośredniego zastosowania w badaniach biologicznych. Dlatego też kolejnym istotnym zagadnieniem poruszonym w pracy był wybór odpowiednich systemów dostarczania badanych związków do komórek nowotworowych i bakteryjnych (cyklodekstryny, liposomy i micelle polimerowe). Ponadto celem przeprowadzonych badań była próba odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób różnice w strukturze fotosensybilizatorów wpływają na wybrane właściwości fotofizyczne i aktywność biologiczną warunkującą ich zastosowanie w terapii fotodynamicznej nowotworów i fotodynamicznej inaktywacji mikroorganizmów.

W pierwszej części wstępu literaturowego Autorka przedstawiła podstawowe informacje dotyczące terapii fotodynamicznej (PDT) oraz opisała światłoterapię w kontekście historycznym. Na pochwałę zasługuje skrupulatny przegląd dotychczasowych doniesień literaturowych. Następnie zostają omówione mechanizmy fotochemiczne PDT prowadzące do generowania reaktywnych form tlenu. Ze zrozumiałych względów (uważa się, że porficyeny ulegają reakcjom fotochemicznym typu II), zagadnienia dotyczące mechanizmów generowania tlenu singletowego omówione są bardziej szczegółowo. Chciałbym jednak poznać opinię Doktorantki na temat praktycznego znaczenia obu mechanizmów w PDT (przekazania energii i przeniesienia elektronu)? Czy przewaga jednego z tych mechanizmów może skutkować korzystniejszym efektem terapeutycznym?

Kolejne podrozdziały zawierają opis właściwości fotosensybilizatorów, krótką charakterystykę porficenów oraz opis wybranych układów przeznaczonych do dostarczania fotosensybilizatorów hydrofobowych do komórek i guzów nowotworowych. Materiał ten został opracowany w sposób zwięzły i zrozumiały. Pewne nieścisłości pojawiają się natomiast w podrozdziałach 2.4 i 2.5. Rysunek 9 jest mało czytelny, i być może lepiej byłoby tu przedstawić elektronowe widma absorpcyjne wybranych endogennych chromoforów wraz z widmem absorpcyjnym najbardziej obiecującego fotosensybilizatora. Z kolei informacje przedstawione na rysunku 2.5 nie są zgodne z tymi przedstawionymi w tekście pracy. Czy rzeczywiście światło z zakresu ok. 700 nm przenika jedynie na głębokość 3 mm? Na stronie 26 Autorka pisze o zjawisku selektywności w terapii fotodynamicznej nowotworów, uzyskanej poprzez specyficzną akumulację PS w komórkach zmienionych nowotworowych. Zgadza się ze stwierdzeniem, iż na selektywność wpływają takie czynniki jak hydrofobowość/hydrofilowość zastosowanych związków, uważam jednak, iż preferencyjna akumulacja PS w komórkach nowotworowych nie zawsze jest czynnikiem koniecznym, szczególnie w późniejszych badaniach *in vivo*. Dla przykładu, protokół PDT z zastosowaniem palladowej pochodnej bakteriofoboru (Padeliporfin, Tookad Soluble) przewiduje naświetlanie guzów już po 10 min. od podania fotosensybilizatora, czyli po czasie uniemożliwiającym



jego lokalizację w komórkach nowotworowych, a mimo to mamy do czynienia z jednym z najbardziej skutecznych fotosensybilizatorów stosowanych klinicznie w leczeniu nowotworów prostaty. Chciałbym w tym miejscu zapytać, czy według Doktorantki można mówić o selektywności PDT w innych aspektach niż ten opisany w pracy? Dalsza część wstępu poświęcona jest mechanizmom biologicznym PDT. Autorka wymienia podstawowe typy śmierci komórkowej wywołanej efektem fotodynamicznym, przy czym niepoprawnie zalicza do nich autofagię. Jak sama zauważyła, w pewnych okolicznościach autofagia może prowadzić do mechanizmów pro-przeżyciowych i zwiększać proliferację komórek. Zabrakło mi w tym miejscu, chociażby podstawowych informacji na temat immunogennej śmierci komórek (ICD), ale mam nadzieję, że Doktorantka uzupełni te braki podczas obrony doktorskiej. Na koniec zostały omówione podstawy fotodynamicznej inaktywacji mikroorganizmów oraz metody i kryteria oceny aktywności środków przeciwdrobnoustrojowych. Tu nasuwa się pytanie, jakie są różnice w kryteriach doboru fotosensybilizatorów do terapii fotodynamicznej nowotworów, a jakie do fotodynamicznej inaktywacji mikroorganizmów? Mimo wymienionych zastrzeżeń, rozdział ten spełnia swoją rolę, gdyż umożliwia czytelnikowi rozprawy doktorskiej zrozumienie istoty podjętych przez Doktorantkę badań i stanowi odpowiednie wprowadzenie w złożoną tematykę badawczą. Wstęp jest również świadectwem dobrego przygotowania teoretycznego Doktorantki do realizacji ambitnych i zróżnicowanych badań.

W rozdziale MATERIAŁY i METODY opisano aparaturę badawczą stosowaną do badań metodami elektronowej spektroskopii absorpcyjnej, dynamicznego rozpraszania światła (DLS), mikroskopii fluorescencyjnej, jak również procedury stosowane podczas naświetlania komórek nowotworowych i bakteryjnych. W dalszej części rozdziału Doktorantka opisuje metodykę badań fizykochemicznych, w tym wyznaczenie wydajności kwantowych i czasów życia fluorescencji oraz wyznaczenie wydajności kwantowych tworzenia tlenu singletowego. Następnie została opisana preparatyka przygotowania liposomów, miceli polimerowych oraz procedura detekcji tlenu singletowego i wolnych rodników za pomocą sond fluorescencyjnych. W rozdziale tym znajduje się również krótki opis stosowanych hodowli komórek nowotworowych i bakteryjnych. Do oceny efektywności fotodynamicznej użytych fotosensybilizatorów Doktorantka zastosowała szereg komplementarnych metod, m. in testów przeżywalności komórek (np. Alamar Blue), mikroskopię fluorescencyjną w połączeniu z odpowiednimi markerami apoptozy/nekrozy oraz technikę obrazowania jądrowego DNA. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na niefortunne sformułowania i drobne błędy, które pojawiły się w tej części opracowania, a wynikały zapewne z pośpiechu Doktorantki w przygotowaniu rozprawy doktorskiej. Przykładowo, na stronie 36 jest: "Measurements of quantum efficiencies (Φ_{Δ})", a powinno być "Determination of singlet oxygen quantum yield (Φ_{Δ})", na stronie 39 jest „Bacteria microscopy”, a powinno być „Confocal microscopy imaging of bacteria”. Podsumowując ten rozdział pracy uważam, że spełnił on swoją zasadniczą rolę, ponieważ znalazły się w nim niezbędne informacje umożliwiające odtworzenie warunków badań przez niezależnych badaczy.

Wyniki i dyskusja badań fizykochemicznych obejmują charakterystykę właściwości optycznych (absorpcyjnych i emisyjnych) badanych fotosensybilizatorów, wyznaczenie wydajności kwantowych tworzenia tlenu singletowego oraz detekcję wolnych rodników w trakcie fotowzbudzenia porfircenów. Badane związki charakteryzują się dużymi wartościami molowych współczynników absorpcji wyznaczonych dla pasma Q: $\epsilon = 36\,000 - 52\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, co umożliwi ich późniejsze stosowanie



w badaniach biologicznych w niewielkich stężeniach. Natomiast wyznaczone wydajności kwantowe tworzenia tlenu singletowego mieściły się w zakresie od 30% do 38%. Wartości Φ_{Δ} uzyskane dla roztworów porfiryn w wodzie deuterowanej były nieco niższe w stosunku do roztworów w toluenie i wyniosły odpowiednio 21% - 28%. Autorka potwierdziła również generowanie tlenu singletowego oraz innych ROS za pomocą odpowiednich sond fluorescencyjnych (SOSG oraz HPF), jednak podeszła do tych wyników z dużą ostrożnością. Z jednej strony należy pochwalić taki sceptycyzm, gdyż nie należy wyciągać zbyt daleko idących wniosków na podstawie pilotażowych eksperymentów, z drugiej zaś strony dyskusja tej części pozostawia poczucie pewnego niedosytu. Wyniki te mogą jednak zostać potraktowane jako zapowiedź dalszych, bardziej pogłębionych i kompleksowych badań mechanistycznych.

Poniżej przedstawiam kilka pytań i wątpliwości do omówionych powyżej zagadnień:

1. W jaki sposób Autorka dokonywała pomiarów fosforescencji tlenu singletowego w ciężkiej wodzie, skoro badane pochodne są silnie hydrofobowe?
2. Jakich innych technik badawczych należałoby użyć w celu potwierdzenia mechanizmu I fotosensybilizacji (identyfikacji rodników hydroksylowych i anionorodnika ponadtlenkowego)?
3. Zabrakło mi wyznaczenia współczynników podziału oktanol/woda dla badanych związków w celu zorientowania się z jak bardzo hydrofobowymi fotosensybilizatorami mamy do czynienia. Ułatwiłoby to interpretację badań biologicznych oraz zależności struktura-aktywność.

Do wstępnej oceny właściwości biologicznych *in vitro* wybrano pochodną Pc. Pierwszy etap tych badań dotyczył określenia fotocytotoksyczności badanych związków wobec komórek raka jajnika (HeLa). Fotosensybilizator dostarczano do komórek albo w postaci miceli typu pluronic lub w postaci liposomalnej. Zastosowane kopolimery F127 okazały się skuteczniejszymi nośnikami badanych związków, gdyż pozwoliły na uzyskanie stabilnych i biokompatybilnych formułacji o rozmiarach miceli rzędu 29 nm, które finalnie doprowadziły do lepszego efektu fotodynamicznego. Stężenie Pc równe 0.7 μM i dawka światła równa 18 J/cm^2 doprowadziły do śmierci całej populacji traktowanych komórek HeLa.

Kolejne podrozdziały Wyników i dyskusji to badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybranych związków wobec szczepów bakterii Gram-dodatnich: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus*. Najlepsze wyniki uzyskano dla pochodnej Pc wobec bakterii *S. epidermidis*, gdyż odnotowano całkowity spadek przeżywalności bakterii przy zastosowaniu łagodnych warunków naświetlania (10 min. dawka światła równa 6 J/cm^2). Z kolei badania zależności struktura-aktywność przeprowadzone na bakteriach *E. faecalis* udowodniły, że kluczowa dla aktywności fotodynamicznej jest ilość podstawników tert-butyłowych przyłączonych do pierścienia porficenu. Nie dziwi mnie, iż pochodna zawierająca cztery takie podstawniki w strukturze jest praktycznie nieaktywna, gdyż zapewne nie wnika do komórek bakteryjnych. Jednak dla potwierdzenia tej hipotezy wskazane byłoby nie tylko jakościowe (rysunki 29-30), ale również ilościowe określenie stężenia każdego z 4 porficenów w komórkach bakteryjnych po różnym czasie inkubacji i po wcześniejszym przepłukaniu buforem PBS.

Ostatnia część wyników dotyczy szczegółowych badań lokalizacji komórkowej, efektu fotodynamicznego i mechanizmów śmierci komórkowych przeprowadzonych na komórkach HeLa. Jest



to prawdopodobnie najciekawsza część pracy. Na pochwałę zasługuje umiejętne zastosowanie wielu, często skomplikowanych technik badawczych. Uzyskane wyniki dowodzą dużej efektywności fotodynamicznej badanych związków przy zastosowaniu krótkich czasów inkubacji. Ze względu na lokalizację jednego z fotosensybilizatorów (pochodnej TTPc) w lizosomach, być może interesującym byłoby w przyszłości poszerzenie badań o rolę autofagii w PDT. Natomiast w eksperymentach nad mechanizmami śmierci komórkowej zabrakło mi zobrazowania uzyskanych wyników w analogiczny sposób do badań przeciwdrobnoustrojowych, a mianowicie przedstawienia zależności przeżywalności komórek od dawki światła przy danym stężeniu fotosensybilizatora. Ciekawe byłoby wówczas porównanie mechanizmów śmierci komórkowej przy zastosowaniu różnych dawek światła. Wiele badań z udziałem różnych fotosensybilizatorów wskazuje, że przy małych dawkach światła dominującym mechanizmem jest apoptoza, natomiast przy sukcesywnym zwiększaniu dawek dochodzi do zmiany mechanizmu w kierunku nekrozy.

Do najważniejszych osiągnięć uzyskanych przez mgr Natalię Masierę zaliczam:

1. Wyznaczenie wydajności kwantowych generowania tlenu singletowego dla pięciu badanych związków oraz wskazanie, iż obok procesów przekazania energii (mechanizm typu II) dochodzi również do fotoindukowanego przeniesienia elektronu (mechanizm typu I).
2. Wybór i optymalizacja formulacji w postaci nietoksycznych miceli polimerowych typu Pluronic F127, w celu dostarczenia badanych związków do komórek nowotworowych i bakteryjnych.
3. Zbadanie aktywności biologicznej wybranych fotosensybilizatorów wobec komórek nowotworowych HeLa zarówno w postaci liposomalnej jak i micelarnej oraz opracowanie skutecznych protokołów *in vitro*.
4. Wykazanie, że niektóre z badanych pochodnych są skutecznymi fotosensybilizatorami w fotodynamicznej inaktywacji bakterii Gram-Dodatnich (po wzbudzeniu badane pochodne generują efektywnie ROS, prowadząc w zależności od zastosowanych warunków naświetlania do obniżenia ilości komórek *S. aureus*, *S. epidermidis* i *E. faecalis* do 6 rzędów logarytmicznych). Najbardziej obiecującym fotosensybilizatorem okazała się pochodna Pc wobec bakterii *S. epidermidis*, gdyż jej zastosowanie doprowadziło do całkowitego spadku przeżywalności bakterii, przy zastosowaniu małej dawki światła (6 J/cm²).

Na wyróżnienie zasługuje fakt, iż wyniki badań wchodzących w zakres rozprawy opublikowano w postaci dwóch oryginalnych artykułów w dobrych specjalistycznych czasopismach naukowych (*Methods Appl. Fluoresc.*, *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*). Ponadto Doktorantka jest autorką trzeciej publikacji niezwiązanej z tematyką doktoratu (*Crystal Growth and Design*). Należy również zaznaczyć, iż Autorka kieruje projektem badawczym finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) pt. „*Mechanizm śmierci komórek nowotworowych, indukowanej terapią fotodynamiczną, z udziałem fotouczulaczy z grupy porfircenów*”, którego wyniki również zostały zamieszczone w ocenianej rozprawie. Doktorantka systematycznie rozszerza zakres swoich zainteresowań naukowych i z powodzeniem prezentuje wyniki badań na konferencjach naukowych, czego byłem naocznym świadkiem. Wysoko oceniam Jej umiejętność nawiązywania kontaktów naukowych i prowadzenia rzeczowych dyskusji.



Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa jest dobrze przemyślana i przygotowana, zawiera elementy nowości naukowej i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Jestem pod wrażeniem szerokiego zakresu przeprowadzonych badań i umiejętności rozwiązywania skomplikowanych problemów naukowych w zakresie interdyscyplinarnej tematyki. Doktorantka wykazała się znajomością licznych technik badawczych, a co najważniejsze samodzielnością w prowadzeniu badań. Przedstawione przeze mnie uwagi krytyczne są zaproszeniem do dyskusji podczas obrony, nie zaś wytknięciem błędów merytorycznych wpływających na końcową bardzo dobrą ocenę pracy. Ponadto część z postawionych przeze mnie pytań można potraktować, jako sugestię do podjęcia dalszych badań w celu głębszego zrozumienia opisanych procesów i wyjaśnienia mechanizmów fotochemicznych i biologicznych. Notabene perspektywy dalszych planów badawczych zostały częściowo przedstawione przez samą Doktorantkę w ostatnim rozdziale pracy. Praca od strony językowej i redakcyjnej jest również bardzo dobrze przygotowana i czytało się ją z prawdziwą przyjemnością.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej PAN o dopuszczenie Pani mgr Natalii Masiery do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę interdyscyplinarną tematykę badawczą oraz wysoki poziom przeprowadzonych badań sugeruję wyróżnienie pracy.

Dr hab. Janusz M. Dąbrowski, prof. UJ