

Prof. dr hab. Krzysztof Gwoździński

Katedra Biofizyki Molekularnej

Uniwersytetu Łódzkiego

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Jerzego Bazaka

pt. „Rola tlenu azotu w odpowiedzi komórek nowotworowych na stres terapii fotodynamicznej; efekt sąsiedztwa” wykonanej w Zakładzie Biofizyki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Witolda Korytowskiego.

Terapia fotodynamiczna (PDT, photodynamic therapy) jest jedną z wielu metod stosowanych w leczeniu chorób nowotworowych. W technice tej reaktywne formy tlenu generowane przez wzbudzony przez światło fotouczulacz (sensybilizator) niszczą komórki nowotworowe na drodze apoptozy lub nekrozy. Stosuje się fotouczulacze endo- lub egzogenne, a światło laserowe o odpowiedniej długości fali doprowadza się w sąsiedztwo guza światłowodem. Wzbudzony światłem fotouczulacz, w zależności od typu reakcji, generuje z obecnego tlenu w komórkach i tkankach, tlen singletowy lub/i anionorodnik ponadtlenkowy prekursor innych reaktywnych form tlenu (RFT).

Skuteczność terapii fotodynamicznej zależy w dużym stopniu od właściwości zastosowanego fotouczulacza, który powinien wykazywać wysoką selektywność akumulacji w tkankach nowotworowych oraz wysoką wydajność wytwarzania tlenu singletowego oraz RFT. Przekładami związków stosowanych w terapii fotodynamicznej są hematoporfiryny, photofrin-syntetyczna pochodna hematoporfiryny, kwas 5-aminolewulinowy (ALA), który jest biologicznym prekursorem protoporfiryny IX (PpIX), wewnętrznego fotouczulacza, oraz wiele innych. Terapia ta stosowana jest również w leczeniu schorzeń nienowotworowych o różnej etiologii.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Jerzego Bazaka wpisuje się w nurt badań prowadzonych przez wiele lat w zespole Pana Profesora Witolda Korytowskiego, związanych z zastosowaniem metody fotodynamicznej w badaniach komórek nowotworowych.

W swojej pracy doktorskiej mgr J. Bazak zajął się indukowaniem stresu fotodynamicznego w komórkach docelowych (targetowych) i ich wpływie na nienaświetlone komórki sąsiadujące.

Rozprawa doktorska ma typowy układ przyjęty dla prac doktorskich i obejmuje streszczenie w językach: polskim i angielskim, wprowadzenie, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję i wnioski końcowe.

W części *Wprowadzenie*, Autor przedstawił aktualny stan wiedzy, ściśle związany z realizowaną pracą doświadczalną. Omówił efekt sąsiedztwa, czyli odpowiedzi komórek sąsiadujących niepoddanych stresowi na sygnały wysyłane przez komórki docelowe, poddane stresowi fotodynamicznemu. Autor postawił hipotezę, że komórki nowotworowe, które przeżyły stres mogą wysyłać sygnały stymulujące proliferację i migrację komórek sąsiadujących. Jedną z cząsteczek sygnałowych jest tlenek azotu (NO) generowany przez odpowiednie syntazy tlenu azotu: nNOS, eNOS i iNOS, który zwiększa przeżywalność i progresję nowotworów.

Następnie przedstawił założenia terapii fotodynamicznej oraz mechanizmy związane ze wzbudzeniem fotouczulaczy i generowaniem tlenu singletowego oraz reaktywnych form tlenu. Omówione zostało zastosowanie kwasu 5- aminolewulinowego w terapii. W dalszej części pracy Autor przedstawił szlaki sygnałowe uruchamiane w czasie terapii prowadzące do apoptozy oraz wpływ tlenu azotu na sygnalizację wewnątrzkomórkową w inicjowaniu lub hamowaniu apoptozy. Tlenek azotu w stężeniach nM ma działanie cytoprotekcyjne, natomiast w stężeniach μM cytotoksyczne oraz onkogenne. Działanie onkogenne NO związane jest z aktywacją kaskady sygnałowej, w której biorą udział liczne białka, takie jak cyklaza guanylowa (cyklaza guanylanowa), czynnik indukujący hipoksję (HIF-1 α), kinaza 3-fosfoinozytydu i inne, które przyczyniają się do przetrwania komórek nowotworowych oraz wpływają na ich proliferację i migrację. Dodatkowo tlenek azotu poprzez tworzenie związków silnie reaktywnych może powodować modyfikację białek prowadząc do ich nitrozowania i/lub nitrowania. Okazuje się, że NO wpływa w istotny sposób na odporność nowotworów traktowanych metodą PDT, a skuteczność terapii można poprawić stosując inhibitory syntaz lub zmiatacze tlenu azotu.

Cel rozprawy doktorskiej został przedstawiony w postaci czterech zagadnień, które uważam, za interesujące, ponieważ przybliżą poznanie odpowiedzi pojawiających się w komórkach sąsiadujących. By zrealizować postawione cele, Autor opracował metodę separatorów, by nie dochodziło do fizycznego kontaktu między komórkami docelowymi a komórkami sąsiadującymi, co miało kluczowe znaczenie w prowadzonych doświadczeniach.

W rozdziale „*Materiały i metody*” Autor na wstępie omówił stosowane w badaniach odczynniki. Dziwnie wyglądają ich nazwy chemiczne podane tylko w języku angielskim. Przedstawił stosowane ludzkie linie komórkowe (raka prostaty PC3, raka piersi MDA-MB-231 oraz COH-BR-1, glioblastomy U87 i czerniaka BLM, RPMI-1640) oraz omówił ich pochodzenie i warunki hodowli.

Komórki były uczulane kwasem 5- aminolewulinowym i napromieniowane światłem pochodzącym z LED-owego źródła światła, ale Autorowi umknął zakres promieniowania. Nie wiadomo, czy było to światło białe, czy monochromatyczne. Odpowiedź na to pytanie znalazłem na stronie 44 pod rysunkiem 8. Mam nadzieję, że Autor ten rodzaj światła stosował również we wszystkich przeprowadzanych doświadczeniach. Zastosowanie różnorodnych technik badawczych, jak spektrofluorymetria, mikroskopia z kontrastem faz, metoda WesternBlot i in., które umożliwiły Autorowi realizację wytyczonych celów. Otrzymane wyniki poddał właściwie zastosowanej analizie statystycznej.

Rozdział *Wyniki* otwiera opis układu doświadczalnego opracowanego przez Autora; napisany jest rzeczowo i udokumentowany licznymi rysunkami, zaopatrzonymi w przejrzyste opisy. Wyniki uzyskane z badań przedstawione na rysunkach zostały poddane dokładnej analizie.

Badając przeżywalność komórek różnych linii w zależności od dawki światła (J/cm^2) przy zastosowaniu tego samego stężenia kwasu 5-aminolewulinowego oraz czasu naświetlania. Autor wykazał ograniczoną śmiertelność badanych komórek różnych linii na poziomie 20-30% dla dawki 1 J/cm^2 . Jedynie linia raka piersi MDA-MB231 charakteryzowała się znacznie wyższą wrażliwością na promieniowanie. Przeżywalność była określona testem MTT, który jest najczęściej stosowanym w analizie aktywności metabolicznej komórek.

Wykorzystując fotouczulone, naświetlone komórki PC3 Autor wykazał znaczną ekspresję syntazy iNOS w komórkach docelowych, któremu towarzyszył podobny wzrost ekspresji tego enzymu w komórkach sąsiadujących. Wprowadzenie zmiatacza tlenu i/lub ditlenku azotu, nitronylo-nitroksydu, cPTIO, hamowało ekspresję iNOS o prawie 90%. Natomiast brak fotouczulacza w badanym układzie nie prowadził do indukcji iNOS.

Z kolei zastosowanie inhibitora Bay11-7082, czynnika transkrypcyjnego NF-kB, prowadziło do spadku ekspresji syntazy iNOS zarówno w komórkach docelowych PC3, jak i sąsiadujących.

Ekspresja iNOS w komórkach docelowych spowodowana była przez RFT, generowane przez wzbudzony fotouczulacz, natomiast w komórkach sąsiadujących przez tlenek azotu.

Zastosowanie specyficznej sondy fluorescencyjnej na tlenek azotu, DAF-FM-DA, wykazało znaczący wzrost fluorescencji po naświetlaniu, co świadczy o generowaniu NO i dobrze koreluje ze wzrostem ekspresji syntazy iNOS. Wzrost fluorescencji obserwowano również w komórkach sąsiadujących, co świadczy o jego migracji do tych komórek. Ponadto tlenek azotu prowadził do istotnego wzrostu proliferacji komórek sąsiadujących, a wprowadzenie inhibitora iNOS, 1400W

hamowało wzrost tych komórek. Indukcja wzrostu komórek sąsiadujących była również silnie hamowana przez zmiatacz tlenu azotu cPTIO.

Naświetlone z fotouczulaczem komórki docelowe PC3, które przeżyły fotodynamiczny indukowały w komórkach sąsiadujących zwiększoną proliferację, ale również większą inwazyjność i szybkość migracji. Procesy te były hamowane przez inhibitor syntazy iNOS, 1400W.

Chcąc potwierdzić kluczową rolę syntazy iNOS w proliferacji i migracji komórek sąsiadujących, Autor zastosował siRNA oraz scrRNA o losowej sekwencji w celu wyciszenia tego enzymu w komórkach docelowych. Zastosowanie siRNA zamiast scrRNA prowadziło do zahamowania wzrostu ekspresji iNOS. Zgodnie z oczekiwaniami, w przypadku komórek sąsiadujących hodowanych z komórkami docelowymi traktowanymi siRNA, obserwowano spadek proliferacji o 50% w porównaniu z komórkami docelowymi traktowanymi scrRNA. Podobny efekt obserwowano w przypadku migracji komórek sąsiadujących.

Kolejnym badaniem przez Autora enzymem była cyklooksygenaza-2 (Cox-2), której ekspresję obserwuje się w różnych typach komórek nowotworowych. Z enzymem tym, związany jest wzrost migracji oraz odporności komórek na apoptozę, jak również wzrost angiogenezy w tkance nowotworowej. Zwykle podwyższonej ekspresji syntazy iNOS towarzyszy ekspresja COX-2.

Opierając się na tych przesłankach, Autor stosując metodę WesternBlot wykazał 7-krotny wzrost ekspresji COX-2 w naświetlonych komórkach docelowych w porównaniu z nienaświetlonymi. Niższą ekspresję tego enzymu obserwował w komórkach sąsiadujących. Zmiatacz tlenu azotu cPTIO hamował ekspresję COX-2 zarówno w komórkach docelowych, jak i sąsiadujących.

Następnym białkiem analizowanym przez Autora była kinaza białkowa B (PKB/Akt), która odgrywa ważną rolę w sygnalizacji promującej przetrwanie oraz migrację komórek nowotworowych. W naświetlonych komórkach docelowych jej aktywacja związana z fosforylacją wzrastała 2-3 razy w stosunku do komórek nienaświetlonych. Natomiast jej aktywacja była nieznacznie niższa w komórkach sąsiadujących. Zmiatacz NO, cPTIO obniżał w komórkach sąsiadujących aktywację Akt ok. 33%.

Aktywację w komórkach docelowych oraz sąsiadujących Autor obserwował również w przypadku kinaz białkowych ERK1/2 aktywowanych mitogenem. Obecność cPTIO nieznacznie hamowało aktywację kinaz ERK1/2 w komórkach docelowych oraz ok. 60% w przypadku komórek sąsiadujących, co świadczy, o wpływie NO na aktywację tych białek.

W dalszej części pracy Autor poddał analizie komórki ludzkiego raka piersi linii MDA-MB-231, w których po naświetleniu z ALA obserwował wzrost ok. 7-krotny syntazy iNOS, a w komórkach sąsiadujących ok. 4-krotny. Efekt ten był mniejszy niż w komórkach linii PC3.

Przeprowadzając badania związane z proliferacją i migracją komórek linii MDA-MB-231 Autor obserwował wzrost obu tych procesów po stresie fotodynamicznym w komórkach docelowych oraz w komórkach sąsiadujących. Zastosowanie inhibitorów syntazy iNOS -1400W oraz zmiatacza tlenu azotu cPTIO prowadziło w obu przypadkach do spowolnienia proliferacji i migracji komórek sąsiadujących. Natomiast użycie wewnętrznego donora tlenu azotu DETA-NONOate w zawiesinie komórek MDA-MB-231 prowadziło do znaczącego wzrostu proliferacji i migracji komórek sąsiadujących, co świadczy o jego kluczowej roli sygnalizacyjnej w stymulowaniu agresywności tych komórek.

Kolejną badaną linią komórkową była ludzka glioblastoma U87, którą poddano stresowi fotodynamicznemu. Autor wykazał wzrost ekspresji syntazy iNOS w komórkach docelowych oraz komórkach sąsiadujących. Natomiast wzrost proliferacji i migracji był mniejszy, ale istotny statystycznie w porównaniu z liniami komórkowymi PC3 i MDA-MB-231. Zastosowanie inhibitora 1400W lub zmiatacza cPTIO znacznie obniżało oba te procesy.

Autor poddał również analizie komórki ludzkiego czerniaka (BML) obserwując najniższą ekspresję iNOS w naświetlonych z kwasem 5-lewulinowym preparatach w porównaniu z liniami komórkowymi wcześniej przedstawionymi, zarówno w komórkach docelowych jak i sąsiadujących. W odróżnieniu od innych badanych komórek nowotworowych nie obserwował istotnego wzrostu zmian w ich proliferacji i migracji.

Ostatnią badaną linią komórkową były komórki ludzkiego raka piersi COH-BR1, w której po stresie fotodynamicznym obserwowano 3-krotny wzrost ekspresji syntazy iNOS w komórkach sąsiadujących. Wprowadzenie inhibitora 1400W prowadziło do 2-krotnego spadku tego efektu. Autor obserwował także wzrost migracji komórek sąsiadujących.

Rozdział *Wyniki* zamyka porównanie podstawowej (konstytutywnej) ekspresji iNOS w badanych liniach komórkowych. Najniższą Autor obserwował w komórkach raka prostaty PC3, a najwyższą w komórkach ludzkiego czerniaka BLM (wzrost 8-krotny).

W rozdziale *Dyskusja* Autor, uzyskane wyniki konfrontuje z rezultatami otrzymanymi przez innych badaczy stosujących głównie radioterapię.

Dyskusja jest obszerna i napisana rzeczowo. Dodatkowo, Autor umieścił w niej schemat pokazujący odpowiedź komórek sąsiadujących na tlenek azotu uwalniany przez komórki docelowe poddane stresowi fotodynamicznemu. Niewątpliwym osiągnięciem Autora jest wykazanie, że ekspresja syntazy iNOS oraz związana z nim nadprodukcja tlenku azotu po stresie fotodynamicznym w komórkach docelowych odgrywa istotną rolę w ekspresji iNOS w komórkach sąsiadujących, ale decyduje również o wzroście ich tempa proliferacji oraz migracji, a także agresywności. Ponadto, wykazał, że wprowadzenie inhibitorów iNOS, szczególnie wpływających na jej transkrypcję, może hamować wyżej wymienione procesy. Autor wprowadził do tego rozdziału trzy rysunki, na których pokazał korelacje między wzrostem szybkości proliferacji i migracji komórek sąsiadujących a ekspresją syntazy iNOS w komórkach docelowych badanych linii komórkowych. Interesującą zależnością jest szybkość proliferacji w badanych liniach komórkowych od ich konstytutywnej ekspresji syntazy iNOS oraz spodziewana długość życia, co może być również przełożone na długość życia pacjentów z danym typem nowotworu.

Podsumowaniem wyników są liczne wnioski jakie wyciągnął Autor z dokonanych badań.

Mimo, że rozprawa jest napisana dobrym językiem polskim i zredagowana bardzo starannie.

Autor nie ustrzegł się kilka błędów:

str. 18 cząsteczka NH_4

str. 22 nadtlenek azotu (ONOO^-)

str. 24 grupy sulfhydrylowe

str. 24 N_2O_3 – trójtlenek diazotu

str. 28 dioksyhemoglobina

str. 69 brak informacji nt. drugiego z donorów tlenku azotu DETA/O, właściwa nazwa ang. DETA-NONOate

str. 83 peroksynitryt

oraz kilku literówek.

Wyżej wymienione niedociągnięcia nie obniżają wartości pracy, a mogą być użyteczne dla Autora przy opracowaniu publikacji.

Badania prowadzone przez mgr Jerzego Bazaka mają nie tylko duże znaczenie poznawcze, ale również aplikacyjne. Dostarczają wielu nowych informacji o sygnalizacji między komórkami, które przeżyły stres fotodynamiczny, a komórkami sąsiadującymi. Na uwagę zasługuje opublikowanie wyników uzyskanych w pracy w czterech dobrych czasopismach naukowych, w których mgr Jerzy Bazak jest pierwszym autorem:

1. J. Bazak, J.M.Fahey, K. Wawak, W. Korytowski, A.W. Girotti. Enhanced aggressiveness of bystander cells in anti-tumor photodynamic therapy model: Role of nitric oxide produced by targeted cells. *Free Radic Biol Med.* 102, 111-121(2016).
2. J. Bazak, J.M.Fahey, K. Wawak, W. Korytowski, A.W. Girotti. Bystander effects of nitric oxide in anti-tumor photodynamic therapy. *Cancer Cell and Microenvironment* 4, 1 (2017).
3. J. Bazak, W. Korytowski, A.W. Girotti. Bystander effects of nitric oxide in of cellular models in anti-tumor photodynamic therapy. *Cancer* 11 (11) 1674 (2019).
4. J. Bazak, W. Korytowski, A.W. Girotti. Nitric oxide-mediated bystander effects of in in anti-tumor photodynamic therapy. *Trends in Photochemistry and Photobiology* 18, 59-67, (2020)

Rozprawa doktorska mgr Jerzego Bazaka jest oryginalnym opracowaniem, a realizacja postawionych celów badań wskazuje na duży wkład pracy, Jego dużą wiedzę, umiejętność samodzielnego planowania i prowadzenia badań naukowych. Wystawia to Autorowi dobrą opinię i świadczy o Jego kompetencji jako badacza, co również jest niepodważalną zasługą promotora, Pana Prof. dr hab. Witolda Korytowskiego.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem uważam, że rozprawa doktorska mgr Jerzego Bazaka spełnia wszelkie wymogi stawiane pracom doktorskim określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o tytułach i stopniach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz. Ust. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr. 164, poz. 1365, z 2010 Nr. 96, poz. 620, Nr. 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr.84, poz. 455) dla rozpraw na stopień doktora.

W oparciu o przedstawioną ocenę pracy, jej wysoki poziom metodyczny i merytoryczny oraz wartość ze względu na aktualną tematykę badań, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Jerzego Bazaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Składam również wniosek o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą Jego Magnificencji Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Łódź, 4 września 2020