

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.

„Ocena przydatności niekonwencjonalnych metod generowania i wykrywania $^1\text{O}_2$ w diagnostyce medycznej”

Mgr. inż. Łukasz Ożóg

Promotor pracy doktorskiej: Dr hab. n. med. David Aebisher, Profesor UR

Wstęp

Terapia fotodynamiczna (z ang. Photodynamic therapy - PDT) to leczenie raka, które wykorzystuje fotogenerowane reaktywne formy tlenu (z ang. Reactive Oxygen Species - ROS) do uszkodzania docelowych komórek. Do generowania ROS metoda leczenia PDT wykorzystuje fotouczulacz (z ang. Photosensitizers - PS), które są wzbudzane przez światło o określonej długości fali oraz mocy, która nie uszkodza zdrowej tkanki. Głównym, generowanym ROS jest tlen singletowy ($^1\text{O}_2$), który reaguje z cząsteczkami komórkowymi, ostatecznie powodując uszkodzenie tkanki i śmierć komórki. Jedną z szeroko stosowanych metod diagnostycznych z wykorzystaniem barwników fotouczulających jest diagnostyka fotodynamiczna, która pozwala zobaczyć zmiany nowotworowe, których nie można zobaczyć konwencjonalnymi metodami. Umożliwia dokładniejszą diagnostykę guzów i różnego rodzaju zmian nowotworowych. Badania nad PDT cechuje charakter diagnostyczny w postaci obrazowania dostarczania PS i pomiar ilości tlenu singletowego wytwarzanego w tkance oraz ilości cząsteczek $^1\text{O}_2$ wymaganych do zabicia pojedynczej komórki.

Materiał i metoda

Do badań użyto materiał biologiczny w postaci wycinków tkanek pobranych od 30 pacjentów z nowotworami głowy i szyi Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego Nr 1 im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie. Badania z użyciem tkanek ludzkich zostały zatwierdzone na mocy Uchwały Nr 143/B/2018 Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie z dnia 22 listopada 2018 roku. Badania przeprowadzono na świeżo wyciętych próbkach normalnej i nowotworowej tkanki krtani tarczycy w łącznej liczbie 30 próbek zdrowej tkanki kontrolnej i 30 próbek tkanki nowotworowej. Objętość badanych tkanek wynosiła ok. $4 \times 4 \times 4$ mm ($6,4 \times 10^{-5}$ L) dla prawidłowej i nowotworowej tkanki krtani oraz ok. $10 \times 10 \times 15$ mm ($1,5 \times 10^{-3}$ L) dla normalnej i nowotworowej tkanki tarczycy. Stężenie zastosowanego w badaniach fotouczulacza w postaci Rózu Bengalskiego, nie przekraczało $5,8 \times 10^{-4}$ M w tkance krtani oraz $1,0 \times 10^{-4}$ M w tkance tarczycy. Do oświetlania próbek użyto laser półprzewodnikowy MGL-III-532 nm/300 mW (CNI Lasers, Chiny) o długości fali 532 nm oraz źródło światła z zakresu widzialnego w postaci lampy halogenowej o mocy 400W, czas naświetlania wynosił od 15 do 40 min. Przeprowadzono badania, których celem było osiągnięcie zabijania komórek nowotworowych, za pomocą fotouczulacza, tlenu i światła laserowego. Dokonano pomiaru T_1 w powierzchniowych i głębokich warstwach tkanek po serii etapów doświadczalnych w postaci naświetlania, w celu określenia potencjalnych różnic w T_1 . Przeprowadzono badanie penetracji fotouczulacza tkanki krtani *in vitro* oraz dokonano analizy związanej z oceną zastosowania PDT w przypadku tego typu nowotworu. Przy współpracy z Kliniką Zakładem Patomorfologii Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego Nr 1 w Rzeszowie Wykonano dokonano badania histopatologiczne tkanek użytych w badaniach. Analizę obrazów

histologicznych wykonano przy użyciu mikroskopu LED Leica DM1000 (LEICA Microsystems, Wetzlar, Niemcy).

Wyniki

Badanie histologiczne tkanek nowotworowych wykazało uszkodzenie jąder komórek nowotworowych krtani i tarczycy w wyniku PDT, po dostarczeniu PS bezpośrednio do tkanki. Obrazy histologiczne wykazały widoczny nabłonek nowotworu z obrazem piknozy komórkowej. Analiza mikroskopowa wykazała również, że po dostarczeniu RB na powierzchnię tkanki i przeprowadzeniu naświetlania, na głębokości większej niż 2 mm nie doszło do zabarwienia tkanki przez RB oraz, że komórki na tej głębokości nie zostały w żaden sposób uszkodzone. Zmierzone czasy T_1 oraz T_2 wykazały skuteczność w ocenie konsumpcji tlenu w trakcie akcji fotodynamicznej poprzez ich wydłużenie. Zastosowane metody badawcze umożliwiły ocenę skuteczności działania terapii poprzez możliwość oceny czasu naświetlania potrzebnego do skonsumowania tlenu obecnego w strukturze tkanek. Sekwencja mapowania T_2 umożliwiła scharakteryzowanie tkanek krtani i rozróżnienie tkanki nowotworowej od tkanki normalnej. Efekt w postaci uszkodzenia komórek po zastosowaniu PDT zarejestrowano tylko w tych warstwach tkanki, w których fotouczulacz bezpośrednio oddziaływał z jej strukturą. Ukierunkowane dostarczanie fotouczulacza, bezpośrednio do tkanki umożliwiło uzyskanie najlepszego efektu terapeutycznego.

Wnioski

Przedstawione badanie wykazało, że PDT jest skutecznym pierwotnym lub alternatywnym sposobem leczenia raka krtani i tarczycy. Fotogenerowany tlen singletowy będący głównym czynnikiem odpowiedzialnym za martwicę komórek podczas fotodynamicznej terapii raka doprowadził do uszkodzenia komórek rakowych, co potwierdziła analiza histopatologiczna. Badania wykazały potencjał terapii fotodynamicznej i rezonansu magnetycznego do rozwiązania problemu leczenia, gdy guz występuje w miejscach chirurgicznie złożonych, na przykład gdy guzy są bezpośrednio sąsiadujące z narządami takimi jak krtień czy tarczyca. Bezpośredni pomiar czasu relaksacji T_1 oraz mapowanie T_2 za pomocą MRI umożliwiło monitorowanie konsumpcji tlenu na skutek akcji fotodynamicznej oraz pozwoliło na zróżnicowanie tkanki normalnej od nowotworowej. Przeprowadzone badania umożliwiły określenie granic stosowania PDT w strukturze tkanek oraz wykazały się przydatnym narzędziem diagnostycznym.