



# UNIwersytet Medyczny

## IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**Wydział Nauk o Zdrowiu**  
**Zakład Nauk Podstawowych**  
**dr hab. n. med. Dorota Diakowska, prof. uczelni**

Wrocław, dn. 19.04.2022 r.

### RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Mileny Julii Szafraniec pt.  
„Wpływ białek transportowych na farmakokinetykę i efektywność fotodynamiczną  
pochodnych chlorofilu”  
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Łukasza Łaczańskiego, prof. IITD PAN we Wrocławiu

#### Ocena wyboru tematu

W recenzowanej pracy poddano analizie oddziaływania fotouczulaczy pochodnych chlorofilu a, takich jak chlorofilid a i cynkowy feoforbid a, z błonowym białkiem transportowym BCRP (białko oporności raka sutka, należące do rodziny białek ABCG2), które jest transporterem rozpoznającym i usuwającym z komórek związki o strukturze porfiryn i chloryn. Doktorantka badała wpływ tych oddziaływań na farmakokinetykę i efekt fotodynamiczny wywierany poprzez badane pochodne chlorofilu. Ponieważ transport substratów o strukturze porfiryn poprzez białko BCRP jest najprawdopodobniej sprzężone z ich przekazaniem na albuminę, zbadano również wpływ albuminy na farmakokinetykę cynkowego feoforbidu a w linii komórek raka piersi MCF-7 oraz w linii komórek śródbłonna naczyń krwionośnych.

Praca ma charakter eksperymentalny, a temat podjęty przez Doktorantkę jest istotny, ponieważ terapia fotodynamiczna jest obecnie stosowana przy leczeniu różnych schorzeń, w tym w systemowej terapii przeciwnowotworowej raka skóry, głowy i szyi, piersi, płuc i w nowotworach przewodu pokarmowego. Jest to terapia nowa, skuteczna i dobrze tolerowana przez pacjentów, a w przypadku nowotworów złośliwych skóry dająca bardzo dobry efekt kosmetyczny.

#### Charakterystyka formalna rozprawy

Rozprawa doktorska składa się z trzech spójnych tematycznie artykułów naukowych, opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych:

1. **Milena J. Szafraniec**, Leszek Fiedor. One ring is not enough to rule them all. Albumin-dependent ABCG2-mediated transport of chlorophyll-derived photosensitizers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 167 (2021), 106001 <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106001>  
IF = 4,38; 100 pkt. MEiN; 90% udziału
2. **Milena J. Szafraniec**. Interactions of chlorophyll-derived photosensitizers with human serum albumin are determined by the central metal ion. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* (2021) <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.2007794>  
IF = 3,39; 70 pkt. MEiN
3. **Milena J. Szafraniec**, Monika Toporkiewicz, Andrzej Gamian. Zinc-substituted pheophorbide a is a safe and efficient antivasular photodynamic agent. *Pharmaceuticals* 15 (2022), 235 <https://doi.org/10.3390/ph15020235>  
IF = 5,86; 100 pkt. MEiN; 85% udziału

Wszystkie artykuły mają charakter eksperymentalny, zostały opublikowane w 2021 roku i na początku roku 2022. W dwóch publikacjach wchodzących w skład cyklu Doktorantka jest pierwszym autorem pracy, a w jednej – jedynym autorem artykułu. Wiodąca rola Pani mgr Mileny J. Szafraniec w zakresie koncepcji i przeprowadzenia badań (90% w pierwszej i 85% w trzeciej pracy) została potwierdzona odpowiednimi oświadczeniami współautorów publikacji. Prace stanowiące rozprawę doktorską ukazały się w renomowanych recenzowanych czasopismach z listy *Journal Citation Reports* z wysokim współczynnikiem wpływu IF, odpowiednio: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* IF=4,38; *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* o IF=3,39 oraz *Pharmaceuticals* IF=5,86. Łączna liczba punktów MEiN za prace wynosi 270, natomiast punkty IF=13,63.

W przedłożonym do recenzji oprawionym wydruku, cykl trzech monotematycznych artykułów wraz z załączonymi suplementami został poprzedzony częścią opisową badania, w której znalazły się kolejno: spis treści, wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe Doktorantki, wstęp zawierający teoretyczne wprowadzenie do tematu badania, cel i zakres pracy, opis wyników, dyskusja, wnioski, bibliografia, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz oświadczenia współautorów publikacji. Część opisowa rozprawy doktorskiej objęła 32 strony tekstu i 53 pozycje piśmiennictwa, natomiast cykl monotematycznych publikacji zajął 57 stron pracy. Łącznie rozprawa doktorska została przedstawiona na 89 stronach druku.

### **Ocena merytoryczna**

Tytuł rozprawy doktorskiej jest zgodny z tematyką artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i odzwierciedla jej zawartość. W rozdziale *Wstęp* Doktorantka omówiła

główne założenia terapii fotodynamicznej, w tym działanie tej metody oraz zalety i rodzaje fotouczulaczy stosowanych w terapii fotodynamicznej. Następnie zamieściła charakterystykę fotouczulaczy pochodnych chlorofilu a, które stanowiły przedmiot przeprowadzonych badań: chlorofilidru a i cynkowego feoforbidu a. W kolejnym opisie Autorka wprowadziła czytelnika w tematykę zagadnienia oporności wielolekowej i roli głównych błonowych białek transportowych przyczyniających się do wystąpienia tego zjawiska. Doktorantka dobrze wyjaśniła związek występujący między wprowadzanymi do organizmu fotouczulaczami, będącymi substratami dla transporterów, a białkami transportującymi indukującymi oporność wielolekową. Podkreśliła również szeroką specyficzność substratową transportera BCRP i obecność tego białka w prawidłowych komórkach wielu narządów. Jako recenzent mam uwagę dotyczącą użycia zbyt dużego skrótu myślowego przez Doktorantkę, która napisała (str.7): „Z tego względu szczególnie wysoką jego (białka BCRP - adnotacja recenzenta) ekspresją cechują się narządy...”. Ekspresją określonych białek cechują się komórki narządów, a nie – narządy. Autorka powinna napisać o „wysokim stężeniu białka BCRP na powierzchni np. hepatocytów wątroby, enterocytów jelita cienkiego, itd. lub ekspresji BCRP w komórkach odpowiednich narządów”. Kolejną moją uwagą dotyczącą rozdziału *Wstęp* jest brak opisu znaczenia albuminy w transporcie zewnątrzkomórkowym i w płynach ustrojowych organizmu ludzkiego. Wydaje się to uzasadnione z uwagi na fakt, że publikacja nr 2 rozprawy doktorskiej dotyczy badań interakcji surowiczej albuminy ludzkiej z cynkowym feoforbidem a i chlorofilidem a oraz określenia kinetyki tych oddziaływań, natomiast publikacja nr 3 jest skoncentrowana na badaniu fotodynamicznej aktywności feoforbidu a w obecności albuminy ludzkiej w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych i linii komórek raka piersi MCF-7. Moje uwagi nie obniżają wartości naukowej tej części rozprawy doktorskiej, która została napisana w sposób przystępny, dobrze wyjaśniający zagadnienia związane z tematem badania i ładną polszczyzną. Piśmiennictwo użyte w tej części pracy zostało odpowiednio dobrane, a kolejność cytowania publikacji jest poprawna.

Pani mgr Milena J. Szafraniec prawidłowo zdefiniowała cele swoich badań, których wyniki zamieściła w trzech publikacjach naukowych. Pierwszym zdefiniowanym celem było zbadanie oddziaływania fotouczulaczy pochodnych chlorofilu a z białkiem transportowym BCRP, a także zdefiniowanie wpływu tych oddziaływań na efekt fotodynamiczny obserwowany w komórkach linii komórkowej raka piersi MCF-7 o podstawowej (podlinia MCF-7/mock) oraz podwyższonej (podlinia MCF-7/ABCG2) ekspresji transportera BCRP. Drugim celem była identyfikacja miejsc wiązania fotouczulaczy do albuminy ludzkiej oraz oznaczenie miejsc dokowania molekularnego pochodnych feoforbidu a do tego białka.

Trzecim celem było zbadanie aktywności fotodynamicznej cynkowego feoforbidu a wobec komórek śródbłonna naczyń krwionośnych i linii komórek raka piersi MCF-7 w obecności i przy braku albuminy ludzkiej.

W dalszej części rozdziału *Cel i zakres pracy* Doktorantka szczegółowo wymieniła zrealizowane zadania badawcze, dodając przy każdym zadaniu opis materiału badania i metod użytych w badaniu. Mocną stroną przeprowadzonych badań jest wykorzystanie w nich nowoczesnych metod badawczych z zakresu biochemii, biologii molekularnej i metod instrumentalnych chemii analitycznej, w tym: spektroskopii absorpcyjnej i emisyjnej, analizy fluorescencyjnej, cytometrii przepływowej, metody oznaczania aktywności ATP-azy, kolorymetrycznego testu cytotoksyczności MTT, ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym poprzedzonej odwrotną transkrypcją (RT-qPCR), mikroskopii konfokalnej i innych. Doktorantka zastosowała również nowatorską analizę *in silico* do opracowania modelu dokowania molekularnego pochodnych feoforbidu a do surowiczej albuminy ludzkiej.

Prawidłowy dobór technik i metod badawczych, dostosowanych do wyznaczonych celów szczegółowych świadczy o znajomości tematyki wykonanego przez Doktorantkę badania. Pozwoliło to na pozyskanie przez Autorkę danych, które zostały zanalizowane statystycznie. Analiza statystyczna danych została przeprowadzona prawidłowo, z wykorzystaniem dobrze dobranych testów i analiz statystycznych.

Rozdział *Wyniki* został napisany prawidłowo. Doktorantka omówiła w nim szczegółowo główne rezultaty przeprowadzonych badań. Do tej części opisu nie mam uwag merytorycznych. Nie mam również uwag do kolejnego rozdziału pracy *Dyskusji*, którego treść umocniła moją pozytywną ocenę dotyczącą oryginalności i nowatorstwa przeprowadzonych badań.

W rozdziale *Wnioski* Autorka zamieściła aż 15 wniosków, będących odzwierciedleniem szerokiego zakresu uzyskanych wyników o wysokiej wartości naukowej.

Kolejną częścią rozprawy jest piśmiennictwo, które zostało prawidłowo zredagowane i zacytowane. Piśmiennictwo jest aktualne, na 53 pozycji bibliograficznych 31 artykułów ukazało się w ciągu ostatnich 10 lat, 19 publikacji pochodzi z lat 2000-2011, a 3 artykuły zostały wydane przed 2000 rokiem i dotyczą zastosowanej metodyki badań.

Streszczenia w języku polskim i angielskim zostały napisane prawidłowo. Każde ze streszczeń zajmuje aż dwie strony tekstu, ale jest to zrozumiałe ze względu na znaczącą liczbę otrzymanych wyników badań.

Ponieważ wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań zostały już opublikowane

w recenzowanych i prestiżowych czasopismach naukowych ze znaczącym IF, a wcześniej zostały poddane wnikliwej ocenie przez recenzentów tych czasopism, moja ocena cyklu publikacji jest ułatwiona. W przypadku przedłożonych publikacji nie stwierdzam żadnych błędów merytorycznych. Co więcej uważam, że artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej charakteryzuje nowatorskie ujęcie tematów badań z wykorzystaniem nowoczesnych metod i technik badawczych, znakomita i budząca podziw wizualizacja uzyskanych wyników badań oraz bardzo dobre opracowanie naukowej tematyki badawczej. Stwierdzam, że założony cel rozprawy doktorskiej został w pełni osiągnięty, a uzyskane wyniki badań stanowią istotny wkład w aktualny stan wiedzy obejmujący dyscyplinę nauki medyczne.

### **Podsumowanie**

Pani mgr Milena J. Szafraniec zrealizowała zamierzony cel badania. Przeprowadziła badanie naukowe poprawnie, przy użyciu prawidłowo dobranych metod i technik badawczych. Wykazała się umiejętnością naukowego rozwiązywania problemu oraz aktualnym stanem wiedzy na opracowany temat. Wykazane przeze mnie błędy i uchybienia w opisie cyklu publikacji nie umniejszają wartości przeprowadzonych badań, zawierających bezspornie elementy nowości.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Mileny J. Szafraniec pt. *„Wpływ białek transportowych na farmakokinetykę i efektywność fotodynamiczną pochodnych chlorofilu”* spełnia warunki określone w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (tj. Dz.U. z 2021r., poz.478 ze zm.). Przedkładam więc Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu **pozytywną ocenę** rozprawy doktorskiej oraz wnioskuje o dopuszczenie mgr Mileny J. Szafraniec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, biorąc pod uwagę nowatorski charakter opracowanego tematu, przeprowadzenie badań przy użyciu szerokiego panelu nowoczesnych metod i technik badawczych, wysoki poziom merytoryczny prac stanowiących rozprawę doktorską oraz istotny wpływ uzyskanych wyników na rozwój dyscypliny wnoszący o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

dr hab. n. med. Dorota Diakowska, prof. uczelni

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
Wydział Nauk o Zdrowiu  
ZAKŁAD NAUK PODSTAWOWYCH  
*Dorota Diakowska*  
dr hab. Dorota Diakowska, profesor uczelni