



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Prof. dr hab. Joanna Saluk-Bijak
Katedra Biochemii Ogólnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

Łódź, dnia 11 kwietnia 2022 r.

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 13-04-2022.....
L.dz. 98/2022.....

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Mileny Szafraniec

W związku z powołaniem mnie przez Radę Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Mileny Szafraniec pt. „*Wpływ białek transportowych na farmakokinetykę i efektywność fotodynamiczną pochodnych chlorofilu*”, poniżej przedstawiam recenzję ww. pracy.

Promotorem w tym przewodzie doktorskim jest dr hab. Łukasz Łaczmanski, prof. IITD PAN.

Pani mgr Milena Szafraniec jest autorką i współautorką licznych publikacji naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Na Jej dorobek naukowy składa się 10 publikacji o łącznym współczynniku oddziaływania IF równym 34,29. Duża liczba i wysoka jakość publikacji świadczą o dynamicznym rozwoju kariery naukowej Doktorantki.

Formalna ocena pracy

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Mileny Szafraniec ma formę spójnego tematycznie zbioru trzech artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych o łącznym IF wynoszącym 13,63 i liczbie punktów MEiN równej 270. Są to prace eksperymentalne, z których dwie zostały opublikowane w 2021 r. i jedna w roku 2022. Dwie z nich to prace współautorskie, w których Doktorantka jest pierwszym autorem, a Jej udział określony na podstawie dołączonych do cyklu zgodnych Oświadczeń współautorów wynosi 90% i 85%. Trzecia publikacja jest monoautorską pracą Doktorantki. Tak znaczny udział mgr Szafraniec we wszystkich publikacjach wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską świadczy o zasadniczej roli Doktorantki w opracowaniu koncepcji, planowaniu i wykonaniu eksperymentów, opracowaniu i dyskusji wyników oraz przygotowaniu manuskryptów. Do zbioru publikacji dołączone zostało 27 stronicowe opracowanie w języku polskim, którego celem jest wprowadzenie w tematykę badań niniejszej rozprawy, jak również uzasadnienie celowości ich podjęcia. W opracowaniu tym Autorka wyróżniła „Wstęp

tel. +48 42 635 44 85

ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

e-mail: joanna.saluk@biol.uni.lodz.pl

➔ www.biol.uni.lodz.pl

teoretyczny”, „Cel i zakres rozprawy” (w którym znalazł się m.in. wykaz przeprowadzonych zadań badawczych), dalej „Wyniki”, „Dyskusję”, „Wnioski”, „Spis literatury” (liczący 53 pozycje, z których połowa pochodzi z okresu ostatnich 10 lat) oraz Streszczenia w języku polskim i angielskim.

W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę Doktorantki na dwa aspekty. Po pierwsze, rozdział II „Cel i zakres rozprawy” stanowi opisowe uzasadnienie podjętej tematyki badań. W opisie tym Doktorantka wykazuje celowość swoich badań odnosząc się do aktualnego stanu wiedzy. Moim zdaniem brakuje jednak jasno sformułowanych celów szczegółowych, które zostałyby przedstawione w typowej formie powszechnie przyjętej dla dysertacji tj. w postaci zwięźle sformułowanych punktów. I drugi aspekt, będący niejako konsekwencją tego pierwszego, moim zdaniem w pracy brakuje jednoznacznie sformułowanych kluczowych wniosków, które zwykle w pracach doktorskich stanowią właśnie bezpośrednie odniesienie do postawionych celów. Doktorantka zawarła oczywiście w dołączonym do cyklu opracowaniu rozdział zatytułowany „Wnioski”, jednak jak dla mnie, jest to bardziej podsumowanie uzyskanych wyników. Zawartość tego rozdziału stanowi bowiem aż 17 punktów sformułowanych w większości w następujący sposób: „Feoforbid a i jego pochodne w wysokich stężeniach (>50 μM) hamują aktywność ATPazową transportera ABCG2”. Lista 17 podobnie ujętych stwierdzeń stanowi bez wątpienia bardzo dobre zestawienie obserwacji, które poczyniła Doktorantka na podstawie przeprowadzonych badań, trudno tu jednak doszukiwać się bardziej uogólnionych konkluzji, które w jasny sposób pozwalałyby na stwierdzenie, że postawione w pracy cele zostały zrealizowane. Nie twierdzą oczywiście, że nie zostały zrealizowane, ale stwierdzenie tego faktu wymaga od czytelnika własnej interpretacji treści przedstawionych w omawianym tu opracowaniu. Można odnieść wrażenie, że Doktorantka sama umniejsza swoim osiągnięciom nie formułując żadnych przełomowych, konstruktywnych wniosków. W związku z tym bardzo proszę Doktorantkę aby w czasie publicznej obrony swojej rozprawy przedstawiła jasno sformułowane cele badawcze oraz ogólne konkluzje stanowiące główne osiągnięcia tego doktoratu.

Merytoryczna ocena pracy

Przechodząc do merytorycznej oceny pracy, należy podkreślić, że opublikowanie badań w czasopiśmie z wysokim współczynnikiem oddziaływania bardzo dobrze świadczy o aktualnym i nowatorskim charakterze podjętej tematyki oraz istotnym znaczeniu osiągnięć. Badania przeprowadzone w ramach recenzowanej pracy doktorskiej miały na celu analizę biodostępności i parametrów farmakokinetyki wybranych związków ocenianych pod kątem ich potencjalnego wykorzystania w fototerapii.

Terapia fotodynamiczna jest nowoczesną i uznawaną na Świecie metodą stosowaną w leczeniu niektórych typów nowotworów oraz innych rodzajów chorób. Większość aplikacji klinicznych dotyczy dermatologii, ale obejmują one także ginekologię, urologię, stomatologię, choroby zakaźne. Terapia fotodynamiczna stanowi istotne uzupełnienie klasycznych metod leczenia nowotworów tj. radio- i chemioterapii, jak również jest alternatywą dla resekcji

chirurgicznych. Metoda ta jest z pewnością mniej inwazyjna niż typowa interwencja chirurgiczna i charakteryzuje się wysoką skutecznością. Zaletą terapii fotodynamicznej jest znaczna precyzja, a co za tym idzie jej niska toksyczność ogólnoustrojowa wynikająca z selektywnej akumulacji fotouczulacza i możliwości stosowania miejscowego naświetlania. Zastosowanie właściwego fotouczulacza jest czynnikiem determinującym skuteczność terapii fotodynamicznej. Z tego względu wciąż poszukuje się co raz to lepszych kandydatów na fotouczulacze o jak najlepszych parametrach aktywności fotodynamicznej, z wysoką wydajnością i selektywnością oraz niską niepożądaną toksycznością.

Badane w pracy związki należą do pochodnych, syntetyzowanego na bazie chlorofilu a, feoforbidu a, i są to cynkowa pochodna feoforbidu a oraz zawierający magnez chlorofilid a. Wybrane cząsteczki o potencjale fotouczulającym zostały wytypowane na podstawie wcześniejszych doniesień literaturowych obejmujących badania *in vitro* i *in vivo*. Prowadząc wieloparametryczną analizę przy użyciu nowoczesnych metod biochemii, biofizyki i biologii molekularnej (w tym transfekcji genu, metod preparatywnych i syntezy zmierzających do wytworzenia badanych pochodnych, metod spektroskopowych, cytometrii przepływowej, analizy cytotoxyczności, mikroskopii konfokalnej, czy Real-time PCR) Doktorantka starała się określić oddziaływanie pochodnych chlorofilu a z białkiem błonowym ABCG2 oraz z albuminą. Jak również ocenić wpływ tych oddziaływań na efektywność fotodynamiczną badanych fotouczulaczy. ABCG2 jest przENOŚNIKIEM UCZESTNICZĄCYM W MECHANIZMIE OPORNOŚCI WIELOLEKOWEJ (inaczej, białkiem oporności raka piersi BCRP) charakteryzującym się szczególnie szeroką specyficznością substratową. Główną funkcją fizjologiczną BCRP jest usuwanie z bezpośrednio narażonych komórek substancji toksycznych zarówno endo- jak i egzogennych, do których należy zaliczyć cząsteczki fotouczulaczy, co uzasadnia wybór modelu badawczego. Natomiast albumina, będąca kluczowym białkiem transportowym osocza, uważana jest za białko, które z jednej strony reguluje biodostępność fotouczulaczy poprzez kompleksowanie tych cząsteczek, zaś z drugiej najprawdopodobniej sprzyja ich usunięciu z komórki współdziałając z białkiem ABCG2. Do badań użyto linii komórkowych komórek raka piersi MCF-7 o podstawowej oraz o podwyższonej ekspresji transportera BCRP, co również wydaje się zrozumiałe. W dalszym etapie prac badawczych, przy użyciu metod spektroskopowych (tj. wyznaczenie widm absorpcyjnych, pomiar poziomu fluorescencji) oraz poprzez dokowanie molekularne, wykonane zostały oznaczenia, których celem było określenie charakteru chemicznych interakcji badanych związków z cząsteczką albuminy. Następnie, na podstawie przeprowadzonych analiz do dalszych badań z udziałem modelowej linii komórek śródbłonna naczyń krwionośnych (HUVEC) wytypowano cząsteczkę cynkowego feoforbidu a. Ten etap miał na celu określenie fotodynamicznego efektu jaki wywołuje kompleks albumina-cynkowy feoforbid a wnikając do komórek śródbłonna, które cechują się ekspresją receptorów dla albuminy, co jak podkreśla Doktorantka może mieć znaczenie w terapii fotodynamicznej zarówno guzów nowotworowych, jak i szeregu innych schorzeń. Jak zatem widać, koncepcja rozprawy doktorskiej jest przemyślana, szczegółowo zaplanowana i wielowątkowa ale jednocześnie spójna.

Na uznanie zasługuje również metodyka badań. Szeroki wachlarz nowoczesnych metod, które zastosowane zostały w przedstawionym cyklu publikacji wraz z deklarowanym bardzo wysokim udziałem Pani mgr Szafraniec w ich realizacji, pozwala wnioskować, że Doktorantka dysponuje znakomitym warsztatem badawczym umożliwiającym realizowanie licznych strategii naukowych na światowym poziomie.

Przeprowadzone badania dostarczyły cennych wyników, które zostały prawidłowo zaprezentowane (w postaci tabel, wykresów w tym histogramów i dot plotów, widm absorpcyjnych oraz wizualizacji modelowania molekularnego i obrazów mikroskopowych) oraz szeroko omówione i przedyskutowane w przedłożonych do oceny publikacjach. Każda z tych prac posiada także Supplement stanowiący uszczegółowienie metod oraz wyników. Wyniki pierwszej z prac pokazały, że badane pochodne feoforbidu a stanowią substraty transportera błonowego ABCG2, a szybkość ich transportu jest zależna od stężenia albuminy obecnej w środowisku zewnątrzkomórkowym. W 24 godzinnym eksperymencie obejmującym cykliczne pomiary oznaczono fluorometrycznie i zwalidowano poprzez pomiar cytometryczny komórkowy poziom badanych fotouczulaczy, a także oznaczono ich fotodynamiczną aktywność z wykorzystaniem testu żywotności MTT. Dla obu pochodnych tj. cynkowej pochodnej feoforbidu a oraz chlorofilidu a zaobserwowano szybszy transport w przypadku linii MCF-7 z podwyższonym poziomem ekspresji BCRP, a dodanie albuminy do środowiska zewnątrzkomórkowego wzmagало uwalnianie tych fotouczulaczy. Natomiast żywotność komórek była zależna od czasu uwalniania fotouczulacza. Metodą cytometrii przepływowej Doktorantka wykazała, że kompleksowanie z albuminą znacząco obniża wchłanianie fotouczulaczy do komórek. Wyniki omawianej pracy rzuciły pierwsze światło na farmakokinetykę badanych pochodnych feoforbidu a, które wykazały się wolniejszym tempem transportu przez BCRP niż ich cząsteczka prekursorowa, ale jednocześnie silniejszym powinowactwem do albuminy, a szczególnie dotyczyło to pochodnej cynkowej. Na podstawie analizy parametrów farmakokinetyki feoforbidu a, który jest najszybciej usuwany z komórek a jednocześnie wykazuje najslabsze powinowactwo do albuminy w porównaniu do jego pochodnych, Doktorantka spekuluje, że istotny efekt fotodynamiczny może być zależny nie tylko od kompleksowania fotouczulacza przez albuminę, która utrudnia jego ponowne wnikanie do komórki, ale także może wynikać z pośredniczenia albuminy w transporcie poprzez odbieranie fotouczulacza z zewnątrzkomórkowej domeny BCRP. W kolejnej publikacji, stosując metody spektroskopowe oraz dokowanie molekularne, Doktorantka potwierdziła, że pochodna cynkowa cechuje się silniejszym niż chlorofilid a wiązaniem do albuminy oraz szczegółowo scharakteryzowała naturę oddziaływań albuminy z pochodnymi feoforbidu a, co może mieć istotne znaczenie dla lepszego zrozumienia molekularnych mechanizmów uczestniczących w transporcie badanych cząsteczek fotouczulaczy. Do dalszych badań Doktorantka wybrała cynkową pochodną feoforbidu a, ze względu na jej silne wiązanie z albuminą. Oceniając aktywność fotodynamiczną feoforbidu cynkowego wobec komórek śródbłonna Doktorantka wykazała jego większą akumulację niż w przypadku komórek MCF-7 (charakteryzujących się wyższą niż komórki linii HUVEC ekspresją genu *ABCG2*) i co za tym idzie silniejszy efekt

fotodynamiczny. Obserwowaną różnicę potęgowała obecność albuminy, która dzięki powierzchniowym receptorom na komórkach HUVEC zwiększała wewnątrzkomórkową, a dokładnie lizosomalną akumulację fotouczulacza, co Doktorantka wykazała metodą mikroskopii konfokalnej. Ponadto, określiła Ona także mechanizm śmierci komórkowej zależny od stężenia wolnej formy fotouczulacza.

Dostarczone wyniki stanowią kopalnię wiedzy i w tym miejscu ponownie proszę Doktorantkę o sformułowanie wartościowych wniosków końcowych wieńczących Jej niezwykle interesującą pracę.

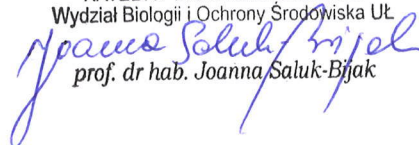
Przechodząc do podsumowania, stwierdzam, że przedłożona mi do oceny dysertacja prezentuje wyniki oryginalnych badań, przeprowadzonych z wykorzystaniem aktualnie stosowanych nowoczesnych metod badawczych. Przedstawione wyniki stanowią oryginalny wkład do nauki i otwierają dalsze interesujące obszary badawcze. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że dokonane przez Doktorantkę odkrycia mają zarówno charakter poznawczy, jak i aplikacyjny, co czyni je w dwójnasób wartościowymi. Całościowo opracowane dzieło wskazuje, że Doktorantka posiada szeroką wiedzę w dyscyplinie naukowej stanowiącej przedmiot Jej zainteresowania.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa Pani mgr Mileny Szafranec „*Wpływ białek transportowych na farmakokinetykę i efektywność fotodynamiczną pochodnych chlorofilu*” spełnia wszelkie wymogi zwyczajowe, stawiane pracom doktorskim, jak również warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789).

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Mileny Szafranec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na nowatorski charakter i wysoki poziom naukowy dysertacji oraz znaczące osiągnięcia, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej.

KIEROWNIK
KATEDRY BIOCHEMII OGÓLNEJ
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UŁ


prof. dr hab. Joanna Saluk-Bjork