

UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Lekarski

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej

dr hab. Marta Kicia, prof. UMW
Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Wrocław, 19.04.2022

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Mileny Julii Szafraniec pt. „Wpływ białek transportowych na farmakokinetykę i efektywność fotodynamiczną pochodnych chlorofilu”

Terapia fotodynamiczna jest metodą wykorzystywaną coraz częściej w leczeniu schorzeń dermatologicznych, różnego rodzaju infekcji oraz litych guzów nowotworowych. Poprzez wykorzystanie fotouczulaczy oraz miejscowego naświetlania światłem o odpowiedniej długości fali w obecności tlenu, powstają reaktywne formy tlenu, a co z a tym idzie, stres oksydacyjny prowadzący do uszkodzenia składników komórkowych, śmierci komórki i ostatecznie zniszczenia tkanki. Jest to niezwykle obiecująca metoda terapeutyczna, gdyż poprzez dobór odpowiedniego fotouczulacza i sposobu jego podania (systemowo lub miejscowo) umożliwia ukierunkowaną indukcję uszkodzeń fooksydacyjnych, co ma szczególne znaczenie zwłaszcza w leczeniu onkologicznym. Zatem poszukiwanie światłoczułych substancji jako potencjalnych fotouczulaczy i ich charakterystyka są kluczowe dla rozwoju terapii fotodynamicznej. Spośród związków o potencjalnym zastosowaniu jako fotouczulacze, szczególnym zainteresowaniem cieszą się pochodne bakteriochlorofili i chlorofili. Niektóre z nich są już dopuszczone do stosowania w terapii wybranych nowotworów, inne są w różnych fazach badań klinicznych. Obiecującymi fotouczulaczami są także podstawione metalami pochodne chlorofilu a: chlorofilid a oraz cynkowy feoforbid a. Jednakże skuteczne stosowanie terapii fotodynamicznej, zwłaszcza w onkologii, może być ograniczone na skutek zjawiska oporności wielolekowej, wynikającej z aktywności białek transportowych, w dużej mierze błonowych transporterów z nadrodziny ABC, usuwających ksenobiotyki z komórek. Zatem

poznanie mechanizmów mających wpływ na farmakokinetykę tych fotouczulaczy jest istotne z punktu widzenia skuteczności terapii.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy analizy oddziaływań chlorofilidu a oraz cynkowego feoforbidu a z białkiem oporności raka piersi (BCRP/ABCG2), jako jednym z kluczowych transporterów z nadrodziny ABC, oraz albuminą, mających wpływ na farmakokinetykę oraz efektywność fotodynamiczną tych fotouczulaczy. Zbadano również aktywność fotodynamiczną cynkowego feoforbidu a wobec linii ludzkich komórek śródbłonna. W kontekście badań nad skutecznością fotouczulaczy w terapii fotodynamicznej temat podjęty przez mgr Milenę Julię Szafraniec jest zatem ważny, aktualny i ma nie tylko walory poznawcze ale także uzasadnienie kliniczne.

Na rozprawę doktorską składa się cykl trzech spójnych tematycznie publikacji wraz ze zwięzłym skryptem zawierającym wstęp, cel i zakres rozprawy, opis najważniejszych wyników zawartych w poszczególnych publikacjach wraz z dyskusją i listą najważniejszych wniosków. Opis uzupełnia spis literatury (53 pozycje z lat 1992-2021) a całość zamykają zwięzłe streszczenia w języku polskim i angielskim. Całość skryptu obejmuje 27 stron.

W dwóch publikacjach doktorantka jest pierwszym autorem natomiast w jednej jedynym. We wszystkich jest też autorem korespondującym. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopiśmie zagranicznym o szerokim zasięgu i wysokich współczynnikach wpływu IF (wszystkie powyżej IF 3, łącznie IF=13,63, pkt. MEiN=270). Z oświadczeń pozostałych autorów, również zaangażowanych w rozprawie, wynika, że doktorantka miała decydujący udział w badaniach, których wyniki stanowią podstawę niniejszego osiągnięcia naukowego.

W **publikacji pierwszej** oraz **drugiej** przedstawiono wyniki analizy oddziaływań chlorofilidu a oraz cynkowego feoforbidu a z białkiem oporności raka piersi (BCRP/ABCG2) oraz albuminą.

Do analizy transportu i aktywności cytotoksycznej fotouczulaczy (**publikacja pierwsza**) wykorzystano linie komórek ludzkiego raka piersi (MCF-7) o podstawowej oraz podwyższonej ekspresji transportera BCRP. Przeanalizowano zarówno proces wchłaniania fotouczulaczy jak również ich wypływ z komórek w obecności albuminy bydlęcej, przy braku lub w obecności inhibitora białka BCRP, fumitremorginu C (pomiar fluorescencji po różnym czasie inkubacji, analiza za pomocą cytometrii przepływownej). W rezultacie pokazano, że zarówno chlorofilid a jak i cynkowy feoforbid a stanowią substraty dla transportera BCRP oraz, że w ich transporcie uczestniczy także albumina, powodując jego przyspieszenie. Tworzenie kompleksów fotouczulacz-albumina reguluje ich biodostępność, najprawdopodobniej poprzez ograniczenie ich wchłaniania

przed komórki oraz odbiór z zewnątrzkomórkowej domeny białka BCRP. W teście oceniającym żywotność komórek (test MTT) po inkubacji z fotouczulaczami i naświetlaniu pokazano, że zarówno poziom transportera BCRP jak i wpływ albuminy na szybkość transportu fotouczulaczy znajdują odzwierciedlenie w podatności komórek na terapię fotodynamiczną. W **drugiej publikacji** z kolei przeprowadzono szczegółową charakterystykę oddziaływań pochodnych chlorofilu a z albuminą. Przeprowadzenie tych badań jest w pełni uzasadnione, biorąc pod uwagę fakt, że jak pokazano w poprzedniej publikacji, to właśnie oddziaływanie z albuminą wpływa na biodostępność chlorofilidu a i cynkowego feoforbidu a. Ponadto, ponieważ potencjalne zastosowanie tych fotouczulaczy w terapii wymaga ich podania dożylnego, oddziaływanie z białkami osocza może znacząco wpływać na efekt w terapii.

Możliwość tworzenia kompleksów fotouczulaczy z albuminą oraz charakterystykę tych kompleksów przeanalizowano za pomocą metod spektroskopowych, stosując zarówno pomiary widm absorpcyjnych fotouczulaczy w zależności od obecności albuminy jak również wygaszania fluorescencji albuminy w zależności od obecności fotouczulaczy, natomiast stałe wiązania wyznaczono analizując wzmocnienie fluorescencji fotouczulaczy w zależności od stężenia albuminy. Zaobserwowano różnice w widmach absorpcyjnych fotouczulaczy w obecności albuminy w stosunku do widm czystych związków, przy czym wzrost absorpcji w obecności albuminy był większy w przypadku pochodnej cynkowej. Powstawanie kompleksów chlorofilidu a i cynkowego feoforbidu a z albuminą zostało potwierdzone także w wyniku pomiarów wygaszania fluorescencji albuminy w ich obecności. Zidentyfikowano również miejsca wiązania fotouczulaczy w albuminie, stosując obserwację wypierania fotouczulaczy przez znane substraty dla miejsc wiążących w białku. Pokazano, że zarówno chlorofilid a jak i cynkowy feoforbid a wiążą się ze wszystkimi trzema subdomenami wiążącymi ligandy, przy czym jako główne miejsce wiązania wskazano subdomenę IB (miejsce wiążące hem). Pokazano także, że wiązanie to jest silniejsze dla pochodnej cynkowej niż dla chlorofilidu a. Powyższe wyniki potwierdzono metodą dokowania molekularnego. Na jego podstawie zidentyfikowano ponadto przewidywane reszty aminokwasowe uczestniczące w wiązaniu fotouczulaczy z albuminą oraz dokonano szczegółowej charakterystyki różnic w ich oddziaływaniu z białkiem. Pokazano również, że wiązanie pochodnych chlorofilu a do albuminy wynika głównie z oddziaływań hydrofobowych oraz tworzenia wiązań wodorowych przez podstawniki boczne ligandów. Pokazano ponadto, że cynkowy feoforbid a indukuje nieznaczną zmianę konformacyjną w cząsteczce białka. Na podstawie powyższych analiz Doktorantka wysnuła wniosek, że rodzaj jonu metalu wpływa na powinowactwo i sposób wiązania pochodnych chlorofilu a do albuminy ludzkiej, co z kolei determinuje różnice obserwowane w farmakokinetyce analizowanych fotouczulaczy.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę umożliwiły wyselekcjonowanie cynkowego feoforbidu a jako potencjalnie lepszego kandydata w terapii fotodynamicznej. Zatem **trzecia publikacja** jest niejako konsekwencją wyników uzyskanych w dwóch poprzednich pracach i stanowi bardzo dobre uzupełnienie opisanych powyżej badań. Celem badań opisanych w tej publikacji była bowiem analiza efektu fotodynamicznego indukowanego przez cynkowy feoforbid a wobec linii ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) w zależności od obecności albuminy. Analizy prowadzono w porównaniu do linii MCF-7 i dotyczyły one oznaczenia żywotności komórek oraz rodzaju śmierci komórkowej indukowanej w wyniku terapii fotodynamicznej. W rezultacie pokazano, że dodanie albuminy powoduje pojawienie się różnic w akumulacji fotouczulacza w zależności od linii komórkowej (akumulacja 2-krotnie wyższa w komórkach linii HUVEC niż w linii MCF-7). Efekt ten przekładał się na większą wrażliwość komórek linii HUVEC na terapię fotodynamiczną. Ponadto, za pomocą mikroskopii konfokalnej pokazano, że lokalizacja cynkowego feoforbidu a w komórkach linii HUVEC różni się w zależności od obecności albuminy ludzkiej. W kompleksie z białkiem fotouczulacz lokalizuje się w lizosomach co, według Doktorantki, sprzyja nasileniu efektu fotodynamicznego.

Dodatkowo wykonano analizę poziomu mRNA genu kodującego białko BCRP, która wykazała dwukrotnie niższą ekspresję tego genu w komórkach linii HUVEC w porównaniu do linii MCF-7, co, biorąc pod uwagę wcześniejsze wyniki badań Doktorantki, niewątpliwie ma wpływ na obserwowane różnice w skuteczności terapii fotodynamicznej.

Analiza rodzaju śmierci komórkowej wykazała, że przy niskim stężeniu cynkowego feoforbidu a dominuje apoptoza, natomiast przy wysokim stężeniu dominuje nekroza. Utworzenie kompleksów z albuminą przy wysokim stężeniu fotouczulacza z kolei daje podobny efekt, jak obserwowany przy niskim stężeniu, czyli dominację apoptozy. W rezultacie Doktorantka pokazała, że jest możliwe dobranie warunków terapii fotodynamicznej tak, aby w większości komórek śródbłonna zaindukować śmierć na drodze apoptozy, co jest efektem pożądanym. Ponieważ komórki śródbłonna charakteryzują się większą wrażliwością na działanie cynkowego feoforbidu a w terapii fotodynamicznej niż komórki linii nowotworowych, Doktorantka słusznie zaproponowała, że fotouczulacz ten może znaleźć zastosowanie w terapii fotodynamicznej skierowanej przeciwko naczyniom krwionośnym.

W związku z powyższym nasuwa się pytanie, czy Doktorantka planuje kontynuować badania i poszerzyć je o analizę oddziaływań cynkowego feoforbidu a z innymi białkami osocza i/lub transporterami błonowymi, które potencjalnie mogą wpływać na jego biodostępność?

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na kilka niedomówień, które wkradły się w polskojęzyczny opis osiągnięcia naukowego:

- w opisie pojawiają się zapożyczenia z języka angielskiego oraz sformułowania żargonowe, np.: (i) „transbłonowy” – jest angielsko-polską mieszanką terminu, który w języku polskim powinien raczej posiadać formę „przezbłonowy” lub „transmembranowy”; (ii) „eksperyment cytometryczny”, „transportowy”, „fotodynamiczny”, czy też „komórki poddane traktowaniu fotodynamicznemu”, „kompleksowanie”, „wytransportowanie” itp. - są to bezpośrednie przekłady z języka angielskiego, które częściowo naturalnie funkcjonują w komunikacji ustnej, ale niestety mają wymiar żargonowy i w formie pisanej, zwłaszcza w opracowaniu naukowym, powinny być bardziej adekwatnie przetłumaczone (np., „analiza metodą cytometrii przepływowej”, „tworzenie kompleksów” itp.).
- pojawiają się również skróty myślowe, np. „stosując 1% stężenie DMSO” – a powinno być „stosując DMSO w stężeniu 1%”;
- lekkie zdziwienie budzi też sposób numeracji stron w formie ułamka, bardziej typowe jest numerowanie stron w sposób prosty, bez uwzględniania wszystkich stron w dokumencie.

Wspomniane powyżej uwagi w niczym nie umniejszają wartości przedstawionej do recenzji pracy a mają na celu jedynie zwrócenie uwagi na pewne aspekty czystości językowej w opracowaniach naukowych.


Wniosek końcowy

Poszukiwanie skutecznych i bezpiecznych związków mogących pełnić funkcję fotouczulaczy w terapii fotodynamicznej, która z założenia jest terapią w minimalnym stopniu ingerującą w organizm pacjenta, powinno być jednym z ważniejszych nurtów, zwłaszcza w leczeniu nowotworów. Zatem temat podjęty przez Doktorantkę ma duże znaczenie poznawcze i potencjał praktyczny. Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej znacznie poszerzają dotychczasową wiedzę na temat oddziaływania pochodnych chlorofilu a z białkami w istotny sposób wpływającymi na ich farmakokinetykę. Na uwagę zasługuje fakt, że zgodnie z oświadczeniami pozostałych autorów, wkład Doktorantki w zaplanowanie badań, ich wykonanie oraz interpretację wyników był decydujący, co świadczy o dobrej znajomości omawianego zagadnienia. Wykonanie badań stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej wymagało opanowania szeregu metod badawczych i niekiedy samodzielnego przygotowania materiału do badań (np. przygotowanie linii

komórkowej z nadekspresją genu kodującego białko BCRP), co z kolei świadczy o biegłości Doktorantki w pracy laboratoryjnej. Doktorantka wykazała się również dużą dojrzałością naukową szczególnie i krytycznie interpretując wyniki swoich badań na tle innych dotychczasowych doniesień oraz umiejętnie planując na ich podstawie dalszą ścieżkę postępowania. Co ważne, Doktorantka bardzo sprawnie zinterpretowała uzyskane wyniki badań w kontekście zastosowania klinicznego zwracając szczególną uwagę na potencjalne różnice w wydajności i mechanizmie transportu fotouczulaczy w warunkach klinicznych w porównaniu do warunków *in vitro* oraz w terapii fotodynamicznej z zastosowaniem cynkowego feoforbidu a u pacjentów onkologicznych z hipoalbuminemią.

W świetle powyższych danych, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Mileny Julii Szafraniec spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z powyższym przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

dr hab. Marta Kicia, prof. UMW

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Wydział Lekarski
KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII
I PARAZYTOLOGII LEKARSKIEJ

dr hab. Marta Kicia, prof. Uczelni