



**Recenzja rozprawy doktorskiej przygotowanej
na Wydziale Biologii i Biotechnologii
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie**

Imię i nazwisko kandydata: **mgr Ewa Grela**

Tytuł rozprawy doktorskiej: **Mechanizmy molekularne związane
z toksycznością amfoterycyny B w świetle badań
mikrospektroskopowych**

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Promotor: **dr hab. Rafał Luchowski, prof. UMCS**

Recenzent: **dr hab. Maria Rapala-Kozik, prof. UJ**

1. Wartość naukowa rozprawy

a. Oryginalność badań

W ostatnich latach rośnie częstotliwość występowania zakażeń powodowanych przez grzyby należące do rodzaju *Candida*. Te komensalne mikroorganizmy, u osób z obniżoną odpornością powodują często tzw. kandydozy układowe, śmiertelne w 40% przypadków. Mała różnorodność dostępnych leków, a także ich nadużywanie w terapii i profilaktyce, przyczyniają się do narastania oporności tych patogenów, co rodzi konieczność poszukiwania nowych lub udoskonalania istniejących terapeutyków. W zakres tej działalności wpisuje się praca doktorska mgr Ewy Grela, w której Doktorantka rozważa problem antygrzybiczego działania amfoterycyny B (AmB), będącej lekiem powszechnie stosowanym w leczeniu przewlekłych grzybic układowych, mimo jego toksycznych efektów wykazywanych także względem komórek gospodarza.

Wyzwaniem, którego podjęła się Doktorantka było wyjaśnienie mechanizmu molekularnego działania tego związku względem obu typów komórek. Co szczególnie istotne, Doktorantka wykorzystała w tym celu nowoczesne techniki badawcze z zastosowaniem pomiarów, bazujących na własnościach spektroskopowych amfoterycyny B. Techniki te wymagały zaawansowanej znajomości metod badania zmian procesów absorpcji i emisji światła przez amfoterycynę B pozostającą w kontakcie z komórkami. Należą do nich między innymi: mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM) czy spektroskopia obrazowania ramanowskiego. Zastosowanie tego rodzaju technik w analizie mechanizmu działania bójczego amfoterycyny B jest podejściem nowatorskim, a same rezultaty tych badań pozwalają na lepsze zrozumienie mechanizmów funkcjonowania antybiotyku i w przyszłości na udoskonalenie

Zakład Biochemii
Porównawczej i Bioanalitik
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48(12) 664 65 27
fax +48(12) 664 69 02
email: maria.rapala-
kozik@uj.edu.pl

jego formy – czy to w odniesieniu do struktury czy formy podaży leku. Zatem badania te wnoszą nowe możliwości w pozyskiwaniu leków nowej generacji.

b. Wartość naukowa rozprawy

Wyniki rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w czterech prestiżowych czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej, o łącznym współczynniku oddziaływania (IF) 19,654, w których Doktorantka jest pierwszym (3 prace) lub drugim współautorem (1 prace), co oznacza, że ich wartość merytoryczna została już wcześniej bardzo pozytywnie oceniona, a recenzentowi pozostaje wyrażenie własnej opinii i ustosunkowanie się do sposobu prezentacji wyników w przygotowanej rozprawie doktorskiej.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

We wstępie rozprawy Autorka umiejętnie wprowadza czytelnika w obraną tematykę badawczą i skrupulatnie charakteryzuje stosowane obecnie leki antygrzybiczne, ze wskazaniem aktualnych poglądów dotyczących mechanizmów ich działania, a także opisuje możliwe mechanizmy samoobrony, wykształcone przez mikroby w odpowiedzi na działanie tych czynników, wskazując m. in. modyfikacje genów kodujących enzymy uczestniczące w formowaniu wybranych składników ściany i błony komórkowej mikroorganizmów, aktywację mechanizmów transportu, a tym samym usuwania leku poza komórkę grzyba, czy modyfikację steroli, z którymi oddziałują antybiotyki polienowe, do których należy amfoterycyna B, by zmniejszyć ich powinowactwo do antybiotyku.

Amfoterycyna B posiada, jak wskazywano wcześniej, niską selektywność działania, co oznacza, że wykazuje także znaczną toksyczność w odniesieniu do komórek ludzkich, skutkującą szeregiem efektów ubocznych jej stosowania, w tym m. in. występowanie niedoborów wapnia i magnezu czy kwasicy metabolicznej. **Zatem, praca ta idealnie wpisuje się w aktualne poszukiwania antybiotyków o obniżonych efektach ubocznych, a przedstawione wprowadzenie dostarcza czytelnikowi niezbędnych informacji i przekonuje o słuszności zaplanowanych działań badawczych.**

W dalszej części pracy Doktorantka skupia się na strukturze cząsteczki AmB i jej możliwości penetracji błony komórkowej, proponując następujące modele: (A) model lokalizacji transbłonowej cząsteczek AmB, (B) model lokalizacji powierzchniowej i (C) model zewnątrzkomórkowych agregatów odsysających sterol (tzw. „gąbek”). By móc dokonać wyboru właściwego modelu działania AmB, Autorka wykorzystuje fakt, że widmo antybiotyku jest wrażliwe na oddziaływanie chromoforu z innymi cząsteczkami i podlega zmianie w przypadku asocjacji cząsteczek antybiotyku. **Hipoteza badawcza została jasno**

sformułowana a dobór metod badawczych, które posłużyły do zbierania informacji o lokalizacji i organizacji przestrzennej leku względem wybranych modeli błon biologicznych, gwarantują możliwość precyzyjnej analizy zaproponowanych modeli.

W części wynikowej Autorka przyjęła strategię prezentacji kolejnych etapów swoich badań według schematu, w którym wstępnie przedstawia uzasadnienie podjętych działań, nawiązując często do informacji literaturowych, następnie prezentuje ich rezultaty, a finalnie przedstawia płynące z nich wnioski. W ten sposób analiza ta staje się coraz bardziej zaawansowana, a czytelnik usatysfakcjonowany rozwiązywaniem kolejnych problemów. To bardzo ułatwia śledzenie działań Autorki, ale uszczupla Jej dalsze możliwości przeprowadzenia wyczerpującej dyskusji wyników.

Wstępnie Doktorantka testowała możliwość wykorzystania metod spektroskopowych w odniesieniu do badanego układu, rozważając ewentualny proces fotodegradacji AmB, czy problem jej wbudowywania w dwuwarstwą lipidową, w warunkach prowadzonych eksperymentów. Testowała także wpływ długości łańcucha acylowego fosfolipidu na orientację przestrzenną antybiotyku oraz wpływ obecności cholesterolu lub ergosterolu w utworzonych testowych liposomach. **Badania te pozwoliły na uzyskanie informacji o preferencji formowania transbłonowych form dimerycznych AmB lub jej agregatów, zorientowanych prostopadle do płaszczyzny błony.**

Uzyskane wyniki stały się punktem wyjścia do zasadniczych rozważań dotyczących lokacji amfoterycyny B w naturalnych układach komórkowych, co miało wyjaśnić problem szkodliwości leku dla komórek gospodarza w miejscu toczącej się infekcji. Mając na uwadze konsekwencje działania AmB w odniesieniu do układu pokarmowego, Autorka wykorzystwała w przeprowadzonych testach komórki nabłonka jelita grubego od zdrowego dawcy i pacjenta onkologicznego. Przeprowadzone badania wykazały, że stwierdzone w obecności steroli wbudowywanie leku w błonę komórkową, może odpowiadać za niekontrolowany proces transportu jonów, prowadzący w konsekwencji do ich „wycieku” z komórki, co może tłumaczyć cytotoksyczne działanie AmB. **Jest to ważny wniosek, wypracowany przez Autorkę w ramach niniejszej pracy. Co więcej, Autorka odnotowała tu także pojawianie się egzosomów, zawierających antybiotyk, co może wskazywać na rozwinięcie przez komórki ludzkie swoistego mechanizmu obrony przed niepożądanym działaniem antybiotyku.**

Ponieważ stwierdzono istotny wpływ obecności steroli na aktywność AmB, w kolejnym kroku Autorka rozważała rolę transporterów lipidowych w sprawności

działania antybiotyku, stosując jako model komórki jajnika chomika chińskiego z aktywnym i nieaktywnym transporterem ABCA1. Badania te wykazały, że większą śmiertelność komórek obserwowano w przypadku nieaktywnego transportera, co skutkowało obecnością cholesterolu w błonie komórkowej, która sprzyjała wbudowywaniu się antybiotyku w dwuwarstwę lipidową z utworzeniem dimerów i zagregowanych jego form, co prawdopodobnie sprzyjało formowaniu kanałów jonowych odpowiedzialnych za wypływ jonów z komórki. **Jest to kolejne cenne spostrzeżenie, które może być bezpośrednio wykorzystane w przyszłej terapii.**

Analogiczne porównania w odniesieniu do bójkowego działania AmB przeprowadzono dla komórek *Candida albicans*, uwzględniając obecność ergosterolu w błonie komórek drożdżowych. Wstępnie ustalono, że ściana komórkowa drożdżaka stanowi istotną barierę dla AmB i ogranicza jej penetrację. Obecność cząsteczek AmB w błonie komórkowej odnotowano głównie w formie zagregowanej, w komórkach drożdżowych będących w stadium pączkowania. Taka lokalizacja może prowadzić do deformacji komórek pączkujących i utrudnienia rozwoju funkcjonalnej ściany komórkowej. Z kolei, nadmiar AmB lokował się w komórkach drożdżowych, we wnętrzu wakuoli i wykazywał niższy poziom agregacji cząsteczek AmB. Ta odmienna lokalizacja może wpływać na przebieg procesów fizjologicznych zachodzących we wnętrzu komórek drożdżowych. **Obie te możliwości wyjaśniają, zarówno konieczność stosowania wysokich dawek AmB w leczeniu infekcji drożdżowych, jak też mechanizm bójkowy tego związku względem komórek patogenu, co stanowi kolejne osiągnięcie Autorki.**

W finalnej części pracy Autorka przeprowadziła podsumowanie wyników w formie krótkich wniosków, które jednak pojawiały się już wcześniej w części wynikowej. Zatem ich skumulowanie w tym rozdziale - nie wzbogaciło znacząco pracy. **Natomiast zaproponowane schematy możliwych form agregacji AmB i ich lokalizacja w błonie komórkowej, zarówno komórek ludzkich jak i komórek patogenów, w znaczący sposób ułatwiły zrozumienie działania tego antybiotyku. Co więcej, Autorka wskazała w tej części pracy potencjalne cele terapeutyczne dla przyszłych procesów udoskonalania wykorzystania AmB w leczeniu infekcji drożdżowych.** Wynikają one bezpośrednio z określenia lokalizacji i mechanizmu działania wskazanych struktur formowanych przez AmB lub jej kombinacji ze sterolami. Autorka zaproponowała w tym względzie własne rozwiązania. I tak, w celu ochrony komórek ludzkich wskazała na proces blokowanie tworzenia wyższych agregatów antybiotyku, poprzez regulację ekspresji transportera steroli. Jako możliwe czynniki regulujące Autorka zaproponowała wykorzystanie statyn lub agonistów wątrobowych receptorów X.

Część dyskusji uzupełniają także wyniki wstępnych badań przeprowadzonych dla ewentualnych koniugatów AmB z albuminą lub nanocząstkami srebra, które mogłyby stanowić zmodyfikowaną formę antybiotyku, o obniżonej cytotoksyczności względem komórek ludzkich i zwiększonej bójczości lub selektywności działania względem patogenów. Jednak są to badania bardzo wstępne, niewątpliwie cenne, bo otwierają kolejne możliwości eksperymentalne, ale nie wnoszą jeszcze istotnego wkładu do rozprawy doktorskiej.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Redakcja pracy, jej styl, szata graficzna są prawidłowe a praktyczny brak literówek budzi moje uznanie. Natomiast układ pracy jest dla mnie dość zaskakujący. Klasyczna rozprawa doktorska zawiera wstęp, cel pracy, omówienie wyników i ich dyskusję. Praca Pani Greli burzy jednak tę konwencję. Jako recenzent nie mam zastrzeżeń do poszukiwań nowych rozwiązań w odniesieniu do prezentacji osiągnięć doktoranta, jednak w przypadku tej pracy mam jednak pewien dyskomfort w tym względzie. Mianowicie, wstęp, oprócz świetnego wprowadzenia w tematykę badawczą zawiera także rozdział typowo metodyczny, w którym Doktorantka przedstawia podstawy zastosowanych metod. Uważam, że ta, skądinąd świetnie i przystępnie przygotowana informacja, z powodzeniem mogłaby wzbogacić część metodyczną, nie zaburzając we wstępie przedstawienia zjawiska biologicznego, które analizowała Doktorantka. Nie jest to jednak tak istotne w porównaniu do części dotyczącej dyskusji, która sprowadza się do podsumowania w punktach uzyskanych wniosków. Natomiast zupełnie niezrozumiała jest konwencja rozdziału pojawiającego się po dyskusji zatytułowanego „dalsze cele badawcze”. Oczywiście każdy recenzent chętnie odnajduje informacje o tym czy kandydat ma dalszą perspektywę swoich badań, lub jakie rozwiązania czy pomysły nasunęły mu się na finalnych etapach pracy. Natomiast w przypadku doktoratu mgr Greli rozdział ten zawiera ponownie zestaw wyników, opatrzone czasem wprowadzeniem, czasem częściową informacją metodyczną. Rozumiem, że miało to za zadanie wskazanie, że takie prace się toczą i dobrze rokują na przyszłość. Natomiast Doktorantka osiągnęła w ten sposób zupełnie przeciwny efekt – raczej wrażenie chaosu w organizacji wyników. A przecież do tej pory praca była bardzo spójna. O ile rozumiem intencję Autorki by przedstawić ten zarys dalszych działań i przekonać, że w tej sprawie już sporo zostało zrobione, to jednak rozprawa redakcyjnie na tym eksperymencie sporo straciła. Ale jednocześnie nie zmieniła mojego wcześniejszego przekonania o wysokiej jakości pracy i możliwościach jej kontynuacji. Uważam, że dane z tej części mogłyby uzupełnić rozdział dotyczący wyników, a w dyskusji można było jedynie rozwinąć informację o otwierających się w ten sposób perspektywach.

Uwagi krytyczne i pytania

1/ sformułowanie „absorpcja światła do elektronowych stanów wzbudzonych” stanowi nie najlepiej brzmiące uproszczenie faktu, że absorpcja światła przez cząsteczkę danego związku prowadzi do przejść elektronów walencyjnych ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego.

2/ w rozważaniach dotyczących perspektywy dalszych badań, Autorka proponuje wykorzystanie albuminy jako nośnika dla AmB, co miałyby zapobiegać agregacji AmB i obniżać jej bójcze własności względem komórek ludzkich. Stąd moje pytania:

a/ czy obecność albuminy obniża także cytotoxiczność AmB względem komórek drożdżowych, co decydowałoby o konieczności uwolnienia AmB z kompleksu z BSA w miejscu infekcji?. Jakie czynniki mogłyby na ten proces mieć wpływ?

b/ czy oszacowano moc wiązania formowanego między albuminą a AmB, by mieć gwarancję ewentualnej odwracalności procesu, tak by docelowo – w miejscu infekcji AmB miała szansę działania toksycznego na komórki drożdży?

c/ czy poziom wiązania BSA przez AmB korelował z jej stężeniem – w pracy mieszanina 1:1 cząsteczek AmB i BSA dawała 25% cząsteczek AmB związanych z BSA. Również dla stosunku molowego ok 1:10 wskazywano 25% cząsteczek AmB związanych z BSA (monomerów). Jak należałoby wyjaśnić ten rezultat braku zmiany w ilości formowanych koniugatów, mimo wzrostu ilości BSA?

3/ W jaki sposób należałoby tłumaczyć mniejszą szkodliwość nanocząstek srebra połączonych z monomerami AmB względem komórek ludzkich z zachowaną własnością grzybobójczą (str. 96)

4/ W opisie formowania nanocząstek zawarto informację, że „ nanocząstki srebra formowano stosując azotan srebra i AmB jako reduktor i stabilizator”. Zatem rodzi się pytanie w jakiej formie występowała tu cząsteczka AmB, po spełnieniu funkcji reduktora i czy zachowywała swoje własności bójcze?

5. Ocena końcowa

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy istotnego problemu poszukiwań skutecznych i bezpiecznych leków antygrzybiczych. Przeprowadzone badania, przy zastosowaniu zaawansowanych metod spektroskopowych, pozwoliły na wskazanie mechanizmów działania amfoterycyny B oraz identyfikację procesów odpowiedzialnych za własności bójcze tego antybiotyku, jak również pokazały

sposoby obrony komórek przed negatywnymi skutkami jego działania. Oceniam te prace bardzo wysoko, bez względu na zawirowania redakcyjne w tekście samej rozprawy, a fakt opublikowania uzyskanych wyników w tak renomowanych czasopismach naukowych tylko potwierdza tę ocenę.

Stwierdzam jednocześnie, że recenzowana rozprawa doktorska Pani Ewy Greli spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr Ewy Greli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na uwadze wartość merytoryczną i naukową badań przeprowadzonych przez mgr Ewę Grełę, zgłaszam także wniosek o wyróżnienie Jej rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.



dr hab. Maria Rapała-Kozik, prof. UJ