



**UNIVERSITY of GDAŃSK**  
**Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki**  
Prof. Dr hab. Piotr Bojarski

Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki

Instytut Fizyki Doświadczalnej

Zakład Biomateriałów i Fizyki Medycznej

Gdańsk, 04.02.2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Ewy Greli**

## **Mechanizmy molekularne związane z toksycznością amfoterycyny B w świetle badań mikrospektroskopowych**

Amfoterycyna B i jej niektóre pochodne zalicza się od lat do bardzo ważnych antybiotyków polienowych ratujących życie w przypadkach wewnątrzustrojowych zakażeń grzybiczych. Mimo postępu w pracach nad zrozumieniem z jednej strony mechanizmu działania terapeutycznego tego antybiotyku a z drugiej jego toksycznością stan wiedzy na ten temat jest niepełny i wymagający dalszych intensywnych badań. Uzasadnieniem dla tych badań są nie tylko względy poznawcze i medyczne ale może przede wszystkim społeczne ze względu na bardzo dużą skalę powikłań w postaci zakażeń grzybiczych w procesie leczenia ciężkich chorób cywilizacyjnych.

Badanie oddziaływań między Amfoterycyną B w różnych postaciach molekularnych (zagregowanych lub niezagregowanych) ze ścianami i błonami komórkowymi a także sposobów dostarczania i dawkowania leku ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia terapeutycznego i toksycznego działania leku i umożliwi świadome prace nad korzystnym przesunięciem relacji tych dwóch aspektów w stronę działania terapeutycznego bądź to samej Amfoterycyny B bądź jej nowych pochodnych.

Praca doktorska Pani mgr Ewy Greli przynależy do tej niezwykle istotnej opisanej powyżej grupy prac badawczych z podkreśleniem szczególnej roli mechanizmów molekularnych warunkujących toksyczność Amfoterycyny B.

Rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Greli stanowi samodzielne, typowo dla doktoratów zbudowane dzieło autorskie. Doświadczalny rdzeń pracy oparty został na czterech opublikowanych w bardzo wysoko cenionych czasopismach pracach współautorskich (2 prace w Scientific Reports i po jednej w Cellular and Molecular Life Sciences oraz w Molecular Pharm.) . W trzech z nich Doktorantka jest pierwszą autorką a w jednej drugą autorką, co pozwala stwierdzić, że jej wkład w powstanie tych prac był decydujący a co za tym idzie i sama rozprawa oparta jest o wypracowane przez nią wyniki i warsztat naukowy. Sama rozprawa mieści się na 110 stronach a jej układ formalny tworzą rozbudowany wstęp, osobno zarysowane cele pracy, sekcja eksperymentalna, wyniki z dyskusją, wnioski końcowe, perspektywy badawcze oraz cytowana literatura licząca 153 pozycje.

Wstęp zawiera autorsko dobrany przegląd najistotniejszych informacji dotyczących grzybic układowych i stosowanych farmaceutyków ze szczególnym uwzględnieniem Amfoterycyny B, jej struktury molekularnej, uprzednio poznanych własności fizykochemicznych , własności spektroskopowych w tym związanych z tworzeniem agregatów oraz syntezę dotychczasowej wiedzy i hipotez naukowych o różnych mechanizmach molekularnych działania Amfoterycyny B. Ponadto część wstępna pracy zawiera informacje ogólne o metodach badawczych, głównie technikach spektroskopowych w zakresie UV-VIS przy wzbudzeniu ciągłym oraz impulsowym wykorzystywanych w pracy oraz w ostatniej części wstępu przegląd wiedzy o sposobach badań i modelach agregacji w dość ogólnie nazwanym podrozdziale „Oddziaływania molekularne”. Tę część pracy czyta się dobrze, selekcję materiału należy uznać za prawidłową i w pełni skorelowaną z dalszą częścią pracy. Bardzo podoba mi się też strona estetyczna pracy zawierająca przejrzystą i dobrze opisaną grafikę.

W rozdziale tym znalazłem zaledwie kilka drobnych niedociągnięć o charakterze redakcyjnym i kilka innych związanych z brakiem precyzji. Z obowiązku Recenzenta wymienię niektóre: Str. 22 „pomiar cząsteczki” zamiast pomiar konkretnej własności cząsteczki, str.31, zamiast „przestrzenne rozmieszczenie” lepiej używać pojęcia „przestrzenny rozkład”. Na stronie 31/32 znaleźć też można nieuprawnione uogólnienie dotyczące braku zależności czasu życia fluorescencji od stężenia (fluoroforu). Jest to prawdą tylko w zakresie stężeń, w którym nie tworzą się agregaty odgrywające zwykle rolę pułapek (akceptorów) dla energii wzbudzenia.

Jako cel pracy Doktorantka jasno definiuje poznanie mechanizmów molekularnych odpowiadających za toksyczne efekty Amfoterycyny B. Obranie tego celu zostaje następnie szczegółowo rozwinięte i uzasadnione. Doktorantka koncentruje się zatem w swojej pracy na poznaniu procesów indukowanych wprowadzeniem Amfoterycyny B i mających miejsce zarówno w komórkach grzybiczych jak i ludzkich. Cel ten Autorka pracy realizuje za pomocą wybranych wysokoczułych technik spektroskopowych i mikroskopowych w zakresie optycznej widma elektromagnetycznego. Należy podkreślić, że Doktorantka miała do dyspozycji spektrum wyrafinowanych, bardzo czułych instrumentów charakteryzujących najlepsze laboratoria europejskie. Ze względu na to, że instrumenty te przy odpowiedniej analizie danych pozwalają dostarczać istotnych informacji o strukturze i organizacji przestrzennej fluoroforów, błon komórkowych czy większych struktur biologicznych, wybór tych technik należy uznać za w pełni uzasadniony dla celów tej pracy. Rozdział „Materiały i metody” przynosi wiedzę zarówno o technikach eksperymentalnych oraz procedurach badawczych służących przygotowaniu badanych układów jak też i świadczy o warsztacie laboratoryjnym Doktorantki. Wszystkie procedury badawcze opisane są dokładnie, jasnym i precyzyjnym językiem. Ani celowość procedur ani sposób przygotowania układów do badań nie budzą moich najmniejszych zastrzeżeń. Z lektury tej wyniosłem przeświadczenie o wysokiej klasy warsztacie doświadczalnym Pani mgr Ewy Greli. Natomiast opis wykorzystanych technik badawczych wraz z uzasadnieniem ich wyboru jest zarówno klarowny jak i syntetyczny. Autorka hołduje tu cenionej przez recenzenta zasadzie : minimum słów przy maksimum treści. Ważnym etycznym aspektem podanego przez Doktorantkę opisu jest także opisanie z czyjej pomocy w niektórych fragmentach swojej pracy korzystała. W rozdziale tym oprócz kilku nieistotnych literówek chciałbym zwrócić Doktorantce tylko jedną uwagę na dość oczywistą omyłkę będącą prawdopodobnie wynikiem skrótu myślowego: na str. 40 w par. 3.2.3 czytamy: „ .. szerokość szczelin na drodze wzbudzenia oraz emisji fluorescencji wynosiła 5 nm” co ma prawdopodobnie odnosić się do parametru szerokości połówkowej linii wzbudzającej i rozdzielczości spektralnej w torze obserwacji uwarunkowanych szerokością szczelin a nie fizycznej szerokości samej szczeliny.

Najbardziej obszerny i najciekawszy rozdział pracy: „ Wyniki badań” charakteryzuje oddziaływanie Amfoterycyny B z komórkami ludzkimi oraz grzybiczymi. Badania eksperymentalne rozpoczyna i kończy wniosek z ważnego testu technicznego dotyczącego potencjalnego wpływu metod optycznych na stabilność fizykochemiczną Amfoterycyny B. Autorka stwierdziła, że zastosowane metody badawcze nie wpływają istotnie na stabilność badanych układów o czym świadczą niemal niezmiennione po długim czasie widma absorpcji oraz niezależność parametrów emisyjnych od czasu naświetlania próbek i mocy źródła w zakresach niezbędnych do prowadzenia pomiarów.

Przeprowadzenie tych testów i przekonujący raport z ich wyników świadczy o bardzo dobrze przemyślanej strategii badawczej i dużej odpowiedzialności Doktorantki za jakość prowadzonych badań.

Cały kluczowy rozdział poświęcony uzyskanym wynikom przez Doktorantkę jest przejrzysty na co niebagatelny wpływ ma przemyślana organizacja badań: od zachowania antybiotyku w środowisku wodnym gdzie Amfoterycyna B wyraźnie silniej agreguje, następnie w wydobyciu różnic w organizacji molekularnej przy jej oddziaływaniu z modelowymi błonami lipidowymi a skończywszy na analizie oddziaływań Amfoterycyny B z ludzkimi liniami komórkowymi i komórkami grzybiczymi.

Za szczególnie wartościowe we wcześniejszej części rozdziału 4 uważam badania nad orientacją przestrzenną i lokalizacją molekuł antybiotyku w modelowych membranach lipidowych wskazujących jednoznacznie na ich wysoką mobilność orientacyjną oznaczającą dalej dość swobodną lokalizację cząsteczek leku na powierzchni membrany. Sytuacja ta ulega wyraźnej zmianie pod wpływem obecności steroli w badanym układzie, która indukuje inkorporację niewielkich agregatów (prawdopodobnie dimerów lub tetramerów) Amfoterycyny B w membranę biologiczną. Spektakularnie nie tylko tu ale i w całej pracy prezentują się zwłaszcza badania metodą FLIM w świetle liniowo spolaryzowanym. Obecność steroli wpływa wyraźnie na wiele innych ważnych wyników eksperymentalnych przedstawionych w pracy, choćby na zmiany amplitud czasów życia fluorescencji wskutek zaindukowanej obecnością steroli redystrybucji organizacyjnej molekuł antybiotyku czy w przypadku ergosterolu na tworzenie agregatów wyższego rzędu. Co istotne wnioski Doktorantki zostały potwierdzone i uzupełnione obliczeniami w zakresie budowy i struktury agregatów a także tworzenia kompleksów amfoterycyny B ze sterolami (obliczenia metodami dynamiki molekularnej). Jest to niezwykle istotne mając na uwadze wcześniej już formułowane i weryfikowane hipotezy badawcze, w myśl których obecność agregatów wyższego rzędu cząsteczek Amfoterycyny B jak np. tetramerów wiąże się z działaniem biologicznym tego antybiotyku. Autorka na podstawie uzyskanych wyników z udziałem cholesterolu sformułowała istotny i ciekawy wniosek co do prawdopodobnego mechanizmu toksyczności Amfoterycyny B, który związany jest z wymuszonym przez nią przemieszczeniem cząsteczek sterolu w membranie biologicznej.

Z kolei na podstawie przeprowadzonych badań nad oddziaływaniem Amfoterycyny B na ludzkie linie komórkowe Autorka sformułowała sporo dalszych szczegółowych wniosków dotyczących toksyczności antybiotyku. Istotnym wnioskiem z badań w tej części pracy jest z pewnością stwierdzenie, że to agregaty antybiotyku odpowiadają za jego toksyczne działanie na ludzkie

komórki. Wniosek ten jest spójny z innymi badaniami prowadzonymi zarówno przez doktorantkę jak i innych autorów w membranach biologicznych. Ponadto toksyczność Amfoterycyny B zarówno w stosunku do prawidłowych jak i zmienionych nowotworowo komórek jest wysoka, przy czym w stosunku do komórek zdrowych jest ona niestety nawet nieco wyższa. W dodatku Autorka zaobserwowała i zilustrowała mechanizm obronny obu typów komórek, w ramach którego cząsteczki antybiotyku są wypierane z obszaru membrany w formie egzozomów. Bardzo ciekawe są wyniki badań aktywności i oddziaływania Amfoterycyny B z komórkami zawierającymi aktywne bądź nieaktywne transportery lipidowe leku uzyskane poprzez pomiary widm fluorescencji oraz czasów jej życia. W komórkach z nieaktywnym transporterem lipidowym ABCA1 zmiany w widmach emisji wskazują na tworzenie agregatów w membranie. O agregacji molekuł leku świadczą też skrócone wyraźnie średnie czasy życia fluorescencji w membranach komórek MMG. Autorka pokazała, że Amfoterycyna B lepiej wnika w membranę w obecności cholesterolu tworząc w niej agregaty pełniące rolę kanałów jonowych.

Warto jeszcze kilka słów poświęcić oddziaływaniu Amfoterycyny B z komórkami grzybiczymi. Uzyskane metodą FLIM wyniki obrazowania rozkładu średnich czasów życia fluorescencji sugerują tworzenie się niewielkich agregatów Amfoterycyny B. Jednocześnie bazując na uzyskanych wynikach można wnioskować, że Amfoterycyna B jest w stanie dostać się do błony komórkowej tych komórek *C. albicans*, które są dopiero w fazie pączkowania, w innych przypadkach ściana komórkowa stanowi zaporę przed działaniem cząsteczek leku.

Praca Pani mgr Ewy Greli zawiera liczne dalsze wyniki i wnioski szczegółowe dotyczące przejawów biologicznej aktywności Amfoterycyny B. Zgromadzony zasób wyników w pracy z pewnością może posłużyć opublikowaniu kilku dalszych ciekawych publikacji. Można odnieść wrażenie, że sumą przedstawionych w pracy wyników i ich analizą można by obdzielić więcej niż jedną pracę doktorską. W dodatku rozdział 6 pracy doktorskiej zatytułowany „Perspektywy dalszych badań – obniżenie toksyczności Amfoterycyny B” to w zasadzie kilkunastostronicowy dobrze udokumentowany wynikami wstępnymi konkretny i świetnie przemyślany plan badawczy na porządnym projekcie naukowym. Wszystko to sprawia, że odnosi się wrażenie iż ta ważna tematyka ma wciąż najlepsze momenty przed sobą a możliwe kierunki jej rozwoju wskazane przez doktorantkę wydają się bardzo prawdopodobne.

W toku lektury wyników zwróciłem jeszcze uwagę na kilka drobiazgów i chciałbym poprosić Doktorantkę o stosowny komentarz:

- 1) Str. 54 – rysunki 4.5-4.7. Z czego wynikają różne wielkości niepewności pomiarowych dla porównywalnych amplitud wielkości na tych rysunkach?
- 2) Str. 75 – rys. 4.25 – Jaka jest rzeczywista liczba zliczeń fotonów w maksimum krzywej zaniku fluorescencji?
- 3) Co doktorantka sądzi o wykonaniu w przyszłości systematycznych badań wiązania amfoterycyny B także z ludzkim białkiem transportującym? Czy z uwagi na wysokie podobieństwo BSA i HSA można się w ogóle spodziewać jakichś ciekawych i odmiennych wniosków co do np. mechanizmu dostarczania leku?

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Greli zawiera liczne cenne i nowatorskie wyniki naukowe uzyskane przy niebagatelny udział wyrafinowanych technik spektroskopowych. Praca ma charakter interdyscyplinarny, korzysta z eksperymentalnych metod fizyki i biofizyki, obliczeń chemii kwantowej zaś ciężar naukowy pracy lokuje się w dyscyplinie nauk biologicznych. Recenzowana praca doktorska w sposób znaczny i przekonujący pogłębia wiedzę o mechanizmach molekularnych oddziaływania i biologicznej aktywności Amfoterycyny B z modelowymi błonami biologicznymi, ludzkimi liniami komórkowymi i komórkami grzybiczymi.

W szczególności Doktorantka przedstawiła spójny obraz mechanizmu toksycznego działania antybiotyku i zaproponowała kierunek badań mający na celu obniżenie toksyczności antybiotyku. Może to doprowadzić do stworzenia bioaktywnych nanomateriałów zawierających aktywne terapeutycznie i mniej toksyczne leki oparte o Amfoterycynę B.

Rozprawa Pani mgr Ewy Greli spełnia z nawiązką ustawowe i zwyczajowe wymogi stawiane pracom doktorskim. Drobne uwagi nie są istotne dla mojej bardzo wysokiej oceny tej pracy a pytania wynikają z ciekawości badawczej. Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr Ewy Greli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie bardzo wysoka wartość merytoryczna uzyskanych wyników naukowych i ich głęboka analiza oraz wszechstronny warsztat naukowy Doktorantki uzasadniają w moim przekonaniu złożenie wniosku o wyróżnienie pracy.

*Piotr Bojarski*