

Válasz Dr. Szabó Dóra, az MTA doktora
opponensi bírálatára

Köszönöm Dr. Szabó Dórának dolgozatom alapos, részletes áttekintését. Köszönöm értő elemzését és támogató véleményét a bemutatott munkáról.

A feltett kérdésekre az alábbiakban válaszolok:

*1. Milyen szempontok alapján esett éppen a *Micrococcus luteus*ra a választás?*

A választásnak egy nagyon egyszerű gyakorlati oka volt. Azon DNS-ek közül, amelyek nagyobb arányban tartalmazzak AT bázispárokat, a *M. luteus*ból izolált DNS volt elérhető kereskedelmi forgalomban.

2. Történtek-e hemolízis vizsgálatok? Az irodalomban a porfirinek esetében milyen erre vonatkozó adatok vannak?

A fotodinamikus kezelések által okozott hemolízis nem megkerülhető kérdés. A porfirin származékok hemolitikus aktivitását számos kutatócsoport vizsgálta. Elemezték és összehasonlították a különböző származékok és kezelési körülmények hatékonyságát, megkülönböztetve a besugárzással párhuzamosan fellépő azonnali és a késleltetett folyamatokat. A korai munkák közül említésre érdemes Grossweiner mtsai közleménye (Grossweiner, L.L. et al (1998) Photosensitisation of red blood cell haemolysis by photodynamic agents. *Lasers Med Scf* 13, 42-54.) A számos porfirin származékra kiterjedő, gondosan tervezett kísérleti körülmények között gyűjtött adat közzétételén túl javaslatot tettek egy matematikai modell felállítására, amely figyelembe veszi például a besugárzási időt és fényintenzitást, a fényérzékenyítő koncentrációját, fotoreaktivitását és affinitását a vörösvérsejtekhez stb. Ennek alapján a PDT kezelések optimális protokollja megtervezhető lehetne.

A tetrafenil porfirin származékokra és a TMPyP-re vonatkozóan munkatársaimmal végeztünk hemolízis vizsgálatokat (Voszka, I. et al. (1998) Effects of tetraphenyl porphyrin derivatives on red blood cells and model lipid systems. *Med Sci Monit* 1998; 4, 600-606.) Eredményeink szerint a hemolitikus aktivitás a származékok membrán kötődési állandójával mutatott jó korrelációt.

A kationos porfirinek hemolitikus aktivitására vonatkozó irodalmi adatok nem egybehangzóak. A tetrakationos TMPyP hemolitikus aktivitása nem elhanyagolható, annak ellenére, hogy membrán kötődési állandója legalább egy nagyságrenddel kisebb, mint például a glikozilált porfirin származékoké. Más eredmények szerint a három pozitív töltésű származék a PDT kezelés körülményei között kismértékű K^+ -permeabilitás változást okozott, de nem befolyásolta a vörösvérsejtek egyéb paramétereit.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a fotodinamikus reakció kockázatot jelent a vér alakos elemeinek integritására nézve; a fényérzékenyítők döntő többsége nem ajánlható teljes vér kezelésére.

3. *Van-e arra vonatkozó adat, hogy a Gram-negatív baktériumokkal szemben hogyan viselkednek a porfirinek, különös tekintettel a kationos porfirinekre?*

Jori és mtsai már a 90' es években javasolták a kationos porfirinek alkalmazását Gram-negatív baktériumok inaktivációjában (Merchat, M. et al. (1996) Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 35, 149-157.). Több publikációban dokumentálták azok hatékonyságát. Ezeket az eredményeket azóta számos szerző megerősítette, eljárásukat továbbfejlesztette. A molekulaszervezet változtatásával sikerült növelni a kationos porfirinek fotostabilitását, szingulett oxigén termelésük kvantumhatásfokát. Mindezek a baktericid hatás további fokozásához vezettek. (Sulek, A., et al. (2020) Photodynamic inactivation of bacteria with porphyrin derivatives: Effect of charge, lipophilicity, ros generation, and cellular uptake on their biological activity in vitro. Int. J. Mol. Sci. 21, 1-34.). Kationos porfirinekre épülő eljárásokat teszteltek különböző kísérleti körülmények között. Bizonyították az E. coli csíraszám 5-7 nagyságrenddel történő csökkenését például vérplazmában, teljes vérben és biofilmek alkotójaként is.

Új perspektívát nyit a baktériumok fotoszenzibilizált inaktivációjában a hatóanyag célba juttatását elősegítő technikák hihetetlen mértékben bővülő tárháza. Ezek között szerepelnek például fém (arany, ezüst, platina) nanorészecskék, szilika hordozók, biopolimer konjugátumok, oligopeptidek, liposzómák, hidrogél filmek, szén nanocsövek. Megfelelő hordozóhoz kapcsolva már neutrális porfirin származékok antibakteriális alkalmazására is lehetőség nyílhat.

Eredményes megközelítése lehet a Gram-negatív baktériumok inaktivációjának az endogén protoporfirin IX-re épülő fotodinamikus reakció. ALA-indukcióval, vagyis az 5-aminolevulinsav intracelluláris koncentrációjának emelésével megkerülhető a PPIX koncentrációját szabályozó feed-back mechanizmus, és így a fiziológias koncentráció többszöröse érhető el. Kutatócsoportunk az elsők között mutatta be az ALA-indukció alkalmazásának lehetőségét Gram-negatív baktériumok inaktivációjában (Szocs, K. et al. (1999) δ -aminolaevulinic acid-induced porphyrin synthesis and photodynamic inactivation of Escherichia coli B, J. Photochem. Photobiol. B Biol. 50, 8-17.). Az eljárás továbbfejlesztésével elérhető a Gram-negatív baktériumokat is tartalmazó biofilmek eliminációja is.

4. *A porfirin származékok membránra kifejtett hatását fel lehet-e használni a COVID-19 pandémiával kapcsolatos védekezésben?*

SARS-CoV vírus a fotodinamikus reakciók potenciális támadáspontja lehet. Az elmúlt évben már történtek erre irányuló *in vitro* vizsgálatok. Az eredmények szerint a metilén kék hatékonyan szenzibilizálja a vírus fotoinaktivációját. Porfirin származékok felhasználására vonatkozó adatok még nem ismertek.

A PDT SARS-CoV elleni felhasználásáról gondolkozva fontos a reális cél megválasztása. A vírus elsődleges terjedési módja (cseppfertőzés) és a szervezetben való elhelyezkedése nem kínál lehetőséget arra, hogy a fotodinamikus reakciót alkalmazzassuk akár a COVID-19 közvetlen átadásának megakadályozására, akár a vírus teljes eliminálására a szervezetben. Felvethető azonban a vírusterhelés lokális csökkentése például a légutakban és a tüdőben. Az orr és szájüreg kezelésének biztató előzetes eredményeiről számoltak be például Moghissi és

mtsai (Moghissi, K. et al. (2020) Does PDT have potential in the treatment of COVID 19 patients? Photodiagn. Photodyn. Ther. 31, 101889).

Szellemes ötletet vetnek fel Kipshidze és mtsai (Kipshidze, N., et al. (2020) Photodynamic therapy for COVID-19. Nat. Photonics 14, 651–652), akik PDT felhasználását javasolják a SARS-CoV-2 által kiváltott akut légúti distressz szindróma (ARDS) kezelésében. Elgondolásuk szerint az eljárás két lépésben fejtené ki hatását: 1) a porfirin származék jelenléte – itt nem részletezett mechanizmus szerint – csökkentené a hemoglobin sérülésének kockázatát, 2) az érintett területek besugárzása csökkenthetné a vírus lokális koncentrációját.

E kutatások fontosságát jelzi, hogy támogatásukat több tekintélyes intézmény munkatársai szorgalmazzák (pl. Harvard Medical School és a San Diego State University, Chukuka, S. et al. (2020) Antimicrobial photodynamic therapy as a potential treatment against COVID-19: A Case for blue light. Photobiomodul. Photomed. Laser Surg. XX. 1-2.)

A fotodinamikus reakció bevethető lenne a vírus terjedésének csökkentésében is, amire két példát említek.

Számos vizsgálat történt arra vonatkozóan, hogy a különböző felületeken megtapadva milyen a vírus túlélésének és érintéssel való továbbadásának lehetősége, pl. liftek nyomógombjai, kilincsek, stb. A megfelelő felszíneken immobilizált fényérzékenyítők a bevont felületek folyamatos fertőtlenítését, vagy legalább azokon a csíraszám csökkentését eredményezhetik (Spagnul, C. et al (2015) Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications. J. Photochem. Photobiol. B-Biol. 150, 11-30.).

A vírus terjesztésének kockázatát növelik a modern épületek fűtési-szellőzési rendszerei, különösen zárt keringetésű rendszerek esetében. Ilyen rendszerekben lenne javasolható a fényérzékenyítő felszínhez kötött vagy vizes oldatban való elhelyezése, kiegészítve a rendszert a megfelelő fényforrással (Lesar, A et al. (Cationic porphyrins as effective agents in photodynamic inactivation of opportunistic plumbing pathogen Legionella pneumophila.)

5. Felhasználhatók-e a porfirinek a burkos vírusok elleni harcban?

Általánosságban azt mondhatjuk, hogy a burkos vírusok érzékenyebbek a fotodinamikus kezeléssel szemben, mint a burok nélküliek. Érdeemes megjegyezni, hogy ezen az alkalmazási területen nem a porfirinek az első vonalbeli hatóanyagok. Ugyanakkor ismertek olyan porfirin származékok illetve kísérleti körülmények is, amelyek alkalmazása burkos vírusok hatékony inaktivációjához vezetnek.

Az eddig közölt adatok szerint a hatékonyság függ az alkalmazott porfirin származék kémiai, fiziko-kémia, fotokémiai tulajdonságaitól (pl. rendelkezik-e töltéssel, milyen a hidrofil-hidrofób karaktere, van-e biológiai aktivitással rendelkező szubsztituense), valamint attól, hogy a vírus sejten belül vagy sejtmentes közegben van-e jelen?

Jó példája a burkos vírusok elleni hatékony fellépésnek a HIV-1 inaktivációja hematoporfirin monometil éterrel. Bizonyos tetra-aril porfirin származékok, szulfonált naftil porfirinek fém komplexei, valamint a dolgozatban is szereplő pozitív töltésű származékok szintén eredményesen alkalmazhatók a HIV-1/2-vel illetve HSV-vel szemben. A közölt adatok alapján ugyanakkor nem állapítható meg koherens szerkezet-hatás összefüggés a porfirin szerkezete és a vírusinaktiváció mértéke között.

Megjegyzendő, hogy a felsorolt vegyületek esetében a fotodinamikus reakció a sejten kívüli szabad vírussal szemben bizonyult hatékonyaknak.

A sejtasszociált vírusok inaktivációjával összefüggésben feltétlenül említésre méltóak az ALA-indukció felhasználásával történt kísérletek. Ez az eljárás alkalmas volt HIV, HPV, HSV elleni védekezésre (Harris, F., Pierpoint, L. (2011) Photodynamic therapy based on 5-aminolevulinic acid and its use as an antimicrobial agent. Med. Res. Rev. 32, 1292-1327.).

Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy a porfirin származékok is potenciális fényérzékenyítők lehetnek a burkos vírusok elleni harcban, de a széles körben használható protokoll kidolgozása még előttünk álló feladat.

6. Melyek a vérkészítményekben előforduló mikróbák, és ezeknek milyen a porfirinokkal szembeni érzékenysége?

Vérekészítményekben előforduló fertőző organizmusok között megjelenhetnek vírusok, baktériumok, gombák és paraziták is. A WHO a vérekészítmények Human Immunodeficiency vírus-ra (HIV), Hepatitis B/C vírusra, Treponema pallidum baktériumra nézve ír elő kötelező szűrést, de a potenciálisan előforduló kórokozók száma ennél lényegesen nagyobb (World Health Organization. Blood safety and availability. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs279/en>. Accessed 20 May 2016.)

A vérekészítményekben előforduló parazitákhoz köthető betegségek a malária, a babéziózis és a Chagas kór. Kórokozói (Plasmodium sp, Babesia sp, Trypanosoma cruzi) eredményes fotodinamikus inaktivációjával kapcsolatban nem állnak rendelkezésre meggyőző adatok.

Számos tanulmány foglalkozik a fotodinamikus reakció felhasználásával a gomba okozta fertőzésekkel szemben, de ezek közül kevés vizsgálja a kezelés alkalmazását a vérekészítmények csírámentesítésével összefüggésben.

Számos porfirin és klorin származékról, valamint az ALA-kezelésről bizonyították, hogy eredményesen szenzibilizálja a *C. albicans* inaktivációját mind a szuszpenzióban, mind biofilmben. Kiemelkedően hatékonyan mutatkozott a FORM, egy öt katinos mezo-tetraaril porfirin származék keverékét tartalmazó készítmény, *C. albicans* inaktivációjában (Soussa, V. et al. (2019). Photodynamic inactivation of *Candida albicans* in blood plasma and whole blood. Antibiotics (Basel) Dec; 8, 221-228.). Ugyanakkor, ki kell emelnünk, hogy a FORM több nagyságrendekkel kisebb csíraszám csökkenést eredményezett plazmában, mint puffer oldatban, teljes vérben pedig hatástalannak bizonyult.

A *Candida* sp. mellett az *Aspergillus* sp.-ről ismert, hogy fényérzékenyíthető többek között klorin származékokkal, metilén késsel, TMPyP-vel. Fotoinaktivációját a körömgombásodásával összefüggésben vizsgálták, vérekészítményekhez kapcsolódó adatokat nem ismerünk.

Baktériumok fotodinamikus inaktivációjáról a 3. kérdés kapcsán már esett szó. Itt kiegészítésül megjegyezném, hogy a vérekészítmények szempontjából kiemelkedő fontosságú *Treponema pallidum* fotoinaktivációjáról, különösen annak vérekészítményekkel kapcsolatos vizsgálatáról nincsenek adataink. Más, elsősorban orálbiológiai szempontból érdekes *Trepanoma* fajok sikeres fotodinamikus inaktivációjára vonatkozó eredmények ismeretesek a szakirodalomban.

Kétségtelen, hogy a vérben jelen lévő kórokozók fotodinamikus inaktivációjának lehetőségéről a vírusokra vonatkozóan legalaposabbak az ismereteink.

A fotodinamikus hatásra való érzékenység szempontjából markánsan különböznek egymástól a membrán burokkal rendelkező és nem rendelkező vírusok. Az előbbi csoportba tartozó HIV-1/2, VSV, CMV, HSV-1/2 eredményesen inaktíválható számos porfirin származékkal:

Photophrin-nel, hematoporfirinnel, benzoporfirin származékokkal, meso-szubsztituált porfirin származékok fém komplexeivel, kationos porfirinekkal. Ezek mindegyikével a vírustiter 5-7 nagyságrendnyi csökkenése érhető el, ha a kezelést puffer oldatban végezzük. Általánosan elmondható, hogy a hatékonyság csökken, több esetben jelentősen csökken, ha a kezelés plazmában, és még inkább, ha teljes vérben történik. Ennek mértékéről az irodalmi adatok ellentmondásosak.

A burokkal nem rendelkező vírusok, például az echovírus, poliovírus, adenovírus sokkal kevésbé illetve nem érzékeny a fotodinamikus kezelésre. Ezekben az esetekben hatékony vírusinaktivációt a porfirin származékok közül kizárólag a három vagy négy pozitív töltésű kationos porfirinekkal sikerült elérni.

Az PDR-ra való érzékenységet vizsgálhatjuk azzal összefüggésben is, hogy RNS vagy DNS vírusról van-e szó. Az irodalmi adatok alapján azt mondhatjuk, a nukleinsav tartalom alapján nem látszik szisztematikus különbség a vírusok között.

Saját kutatási programunk keretében Nemzeti Népegészségügyi Központ munkatársaival együttműködésben kationos porfirinnel (TMPyP) szenzibilizált Enterovírus (echovirus-11) inaktivációjának lehetőségét tanulmányoztuk. Eredményeink szerint puffer oldatban a TMPyP rendkívül hatékonynak bizonyult, de hatékonysága szérumban drasztikusan csökkent. Ez a tapasztalat összhangban van más, fent említett irodalmi adatokkal.

Tisztelettel kérem a válaszaim elfogadását.

Budapest, 2021. január 25.



dr. Csik Gabriella