

Prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka

Lublin, dnia 27 lutego 2023r.

OCENA

rozprawy doktorskiej pt. „Polietylenoglikolowe pochodne porfiryn i kurkuminy – synteza oraz ocena właściwości fizykochemicznych i aktywności biologicznej” opracowanej przez **mgra farm. Dawida Łażewskiego** ubiegającego się o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, pod kierunkiem naukowym promotorów **prof. dr hab. Marka Muriasa** oraz **dr hab. Marcina Wierzchowskiego**.

Ocena rozprawy doktorskiej mgra farm. Dawida Łażewskiego została mi powierzona przez Kanclerz Kolegium Nauk Farmaceutycznych prof. dr hab. Judytę Cielecką-Piontek pismem z dnia 6 lutego 2023 r. (Nr KNN 160/2023), w oparciu o uchwałę nr 9/2023 Kapituły Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego imienia Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Pan mgr Dawid Łażewski jest absolwentem Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Ukończył studia na kierunku farmacja, a w trakcie studiów był członkiem Studenckiego Koła Naukowego „Projektowania i Syntezy Leku” przy Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych. Tytuł magistra farmacji uzyskał w 2014 roku broniąc pracy pod tytułem: „Synteza metoksyowych i hydroksyowych pochodnych trans-stilbenu oraz ocena ich wpływu na aktywność aromatazy zależnej od cytochromu P450”. Promotorem pracy był dr n. farm. Marcin Wierzchowski. Doktorant jest autorem 8 publikacji z listy filadelfijskiej o sumarycznym współczynniku IF 39,202 oraz sumarycznej liczbie punktów MNiSW - 890. Ponadto dorobek naukowy Doktoranta obejmuje 6 polskich streszczeń zjazdowych. Otrzymał również dofinansowanie projektu dla młodych naukowców i pracowników nauki UMP.

Przedstawioną do oceny rozprawę doktorską stanowi zbiór powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Zbiór obejmuje trzy prace - dwie prace oryginalne i jedna przeglądowa - opublikowane w latach 2022-2023 w czasopiśmie, które w roku opublikowania artykułu w ostatecznej formie były ujęte w wykazie sporządzonym zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267 ust. 2 pkt 2 lit. b. Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej były finansowane z grantów Narodowego Centrum Nauki: OPUS UMO-2021/43/B/NZ7/02476 oraz OPUS 2019/35/B/NZ7/01165. Sumaryczny Impact Factor trzech publikacji wynosi 12,416, a suma punktów MEiN – 300.

Wkład Doktoranta w artykule przeglądowym polegał na przeglądzie literatury dotyczącej tematyki „pegylacji”, przygotowaniu manuskryptu oraz przygotowaniu rycin. Udział Doktoranta w pracach oryginalnych polegał na syntezie badanych związków, tj. porfiryn i związków kurkuminowych, ich charakterystyce spektralnej i opisanie struktury, analizie widm i wyników oraz przygotowaniu manuskryptu, a także wykonaniu pomiarów generowania tlenu singletowego. W każdej z wymienionej pracy Doktorant jest pierwszym autorem. Biorąc powyższe pod uwagę należy uznać wkład Pana mgra Dawida Łażewskiego zarówno w prowadzenie badań naukowych jak i powstanie artykułów za znaczący. Warto również podkreślić interdyscyplinarność warsztatu naukowego Doktoranta.

W autoreferacie Kandydat zamieścił również wykaz dodatkowych prac swojego współautorstwa o wysokim IF (str. 11), wypełniając w ten sposób kolejne kryterium formalne w uzyskaniu stopnia doktora, wynikające z zapisu art. 196 ust 1. P.3a, zgodnie z którym kandydat (oprócz prac składających się na cykl) powinien posiadać w swoim dorobku co najmniej jeden artykuł naukowy opublikowany w czasopiśmie naukowym z wykazu objętego zapisem ustawowym.

Celem rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu krótkich łańcuchów polietylenoglikolu (PEG) na aktywność cytotoksyczną porfiryn i kurkumin przeciwko komórkom nowotworowym w dwóch rodzajach terapii – fotodynamicznej i klasycznej.

Uzasadniony rozwój badań *in silico* w ostatnich latach nad opracowaniem struktury chemicznej przyszłego leku zwiększa, w porównaniu do metod tradycyjnych, prawdopodobieństwo uzyskania związku o pożądanej aktywności w odniesieniu do celu molekularnego. Uzyskanie związku o takiej aktywności nie rozwiązuje jednak problemu jego dostępności do celu molekularnego zlokalizowanego w komórce.

Opracowanie modyfikacji związku o optymalnej rozpuszczalności zarówno w wodzie jak i lipidach poprawia biodostępność i zwiększa prawdopodobieństwo osiągnięcia celu molekularnego i tym samym oczekiwanego efektu cytotoksycznego/farmakologicznego. Doktorant postanowił przebadać, czy aktywność cytotoksyczna porfiryn i kurkumin w odniesieniu do komórek nowotworowych poprawi się gdy ich struktura chemiczna zostanie zmodyfikowana przez wprowadzenie glikolu polietylenowego (tzw. „pegylacja”). Z uwagi na to, że glikol polietylenowy składa się z łańcuchów zawierających naprzemiennie grupy etylenowe i atomy tlenu można oczekiwać, że zwiększy się również rozpuszczalność takich pochodnych zarówno w wodzie jak i lipidach. O skuteczności „pegylacji” przekonuje zastosowanie kliniczne wielu leków zarejestrowanych przez FDA (Tab. 1). Cel pracy jest zatem dobrze zdefiniowany, a tematyka jest ważna i aktualna.

Równocześnie pojawia się pytanie czy taka modyfikacja poprawiająca rozpuszczalność nie pogorszy oddziaływania na cel molekularny. W odniesieniu do związków wybranych w pracy doktorskiej – porfiryn i kumaryn - których cytotoksyczność jest aktywowana światłem (terapia fotodynamiczna) te obawy Autor rozwiewa stwierdzeniem, że zwiększenie długości łańcucha zwiększa cytotoksyczność po naświetlaniu, nie ma jednak wpływu na cytotoksyczność w ciemności.

Trwałe połączenie fotouczulacza z PEG zapewni lepszą biodostępność, ale czy selektywność - wybiórczość działania? Autor wspomina, ale nie wyjaśnia (str. 19) w jaki sposób pokonujemy problem selektywności działania w stosunku do komórek nowotworowych. Ponadto pozostaje jeszcze jedna ważna kwestia do wyjaśnienia – do jakiej głębokości w tkance promieniowanie podczerwone będzie w stanie skutecznie aktywować cząsteczkę proleku.

Trochę kontrastują ze sobą ostatnie zdanie wprowadzenia oraz cel pracy: Autor z jednej strony wskazuje na potrzebę bardziej szczegółowych badań porównujących efekty stosowania różnych długości i liczby łańcuchów, ale za cel pracy obrał wpływ jedynie krótkich łańcuchów PEG na aktywność cytotoksyczną porfiryń i kurkumin.

Celem pierwszej publikacji był przegląd literatury dotyczącej „pegylacji”, ze szczególnym uwzględnieniem różnic pomiędzy białkami, nośnikami leków, fotouczulaczami i lekami małowcząsteczkowymi. W artykule zwrócono uwagę na wykorzystanie głównie łańcuchów PEG o masie kilku kDa. Opisano metody łączenia PEG z modyfikowanymi cząsteczkami. Porównano także różnice w wykorzystywanych modyfikacjach. W artykule Autor zwraca uwagę również na słabe strony „pegylacji”, w tym za jedną z najważniejszych uznaje powstawanie przeciwciał skierowanych przeciwko PEG u pacjentów po otrzymaniu pierwszej kuracji „pegylowanym” lekiem. Może to doprowadzić do wytworzenia oporności na kolejne terapie i zaprzepaścić lata badań włożonych w rozwój tej obiecującej modyfikacji. We wnioskach podkreślono potrzebę dalszych bardziej szczegółowych badań nad wpływem długości łańcucha oraz ilości łańcuchów wprowadzanych do cząsteczek, zwłaszcza w przypadku bardzo krótkich łańcuchów PEG. Artykuł stanowi bardzo dobre wprowadzenie do założeń badań opublikowanych w kolejnych dwóch pracach.

W pierwszej oryginalnej publikacji o związkach porfiryńowych Doktorant opisał otrzymywanie związków tej grupy, modyfikowanych krótkimi łańcuchami PEG. Następnie ich charakterystykę fizyko-chemiczną, badania fotochemicznych właściwości otrzymanych porfiryń, symulacje własności spektralnych oraz badania aktywności fotodynamicznej w modelu hodowli komórkowych *in vitro* na liniach komórek – raka pęcherza moczowego (5637), gruczolakoraka prostaty (LNCaP), oraz czerniaka (A375). Kandydat w opublikowanych badaniach wykorzystał zaawansowane technologicznie i metody:

1. w celu uzyskania charakterystyki otrzymanych związków - spektrometrię mas, spektroskopię 1D i 2D NMR, spektroskopię UV-Vis oraz spektroskopię IR;
2. czystość uzyskanych związków potwierdzono techniką HPLC;
3. symulacje widm absorpcyjnych z zastosowaniem teorii funkcjonału gęstości (DFT) programem Gaussian 09 oraz porównanie ich z widmami eksperymentalnymi, a także obliczenia określające udział poszczególnych orbitali molekularnych w obserwowanych przejściach w UV-vis;
4. do pomiarów wydajności generowania tlenu singletowego wykorzystał metodę bezpośredniego pomiaru luminescencji w podczerwieni.

Ostatnim etapem było badanie aktywności fotodynamicznej na trzech liniach komórek nowotworowych (5637 – rak pęcherza moczowego, LNCaP – gruczolakorak prostaty, A375 – czerniak) z wykorzystaniem testu MTT. W badaniach aktywności biologicznej potwierdzono

silne działanie porfiryń wolnych i cynkowych przeciwko dwóm liniom komórkowym LNCaP i 5637. Komórki badanej linii czerniaka okazały się najbardziej odporne na działanie fotouczulaczy. Na szczególną uwagę zasługuje wartość IC50 dla komórek linii 5637, która dla najbardziej aktywnego związku wynosiła 8 nM po naświetleniu komórek dawką światła 10 J/cm².

W mojej ocenie w przeprowadzonych badaniach trochę brakuje symetrii w wysiłku nad wiarygodnością otrzymanych rezultatów. Z jednej strony bardzo duży nakład pracy i bardzo zaawansowane techniki w celu otrzymania związków do badań biologicznych, z drugiej strony, badania biologiczne oparte jedynie na teście MTT. Wiarygodność tego testu, w środowisku wolnych rodników, co ma miejsce przy generowaniu tlenu singletowego, może być ograniczona. Mając powyższe na uwadze zalecałbym potwierdzenie otrzymanych rezultatów uzyskanych w teście MTT innym testem cytotoksyczności, o innym mechanizmie działania. Ponadto wyjaśnienia wymaga liczebność prób użytych do testów statystycznych – wydaje się, że wyliczanie rozkładu normalnego tam gdzie użyto tylko dwóch lub trzech prób może być mało wiarygodne. Szkoda nie docenić wysiłku włożonego w pierwszym etapie badań – uzyskanie związków do badań biologicznych, poprzez badanie ich aktywności biologicznej jedynie procedurą o ograniczonej wiarygodności. Na tym etapie pojawia się jeszcze kolejne pytanie – jakie kryteria przyjęto przy wyborze linii nowotworowych do badań.

Głównym celem ostatniej publikacji było otrzymanie związków kurkuminowych zawierających krótkie łańcuchy PEG składające się z trzech jednostek glikolu. Następnie ich charakterystyka fizyko-chemiczna, symulacje właściwości ADMET (absorpcja, dystrybucja, metabolizm, eliminacja, toksyczność), badania aktywności cytotoksycznej na liniach komórkowych. Następnie szersze badania porównawcze mające wyjaśnić wpływ wprowadzenia łańcuchów PEG na aktywność biologiczną kurkumin. Oprócz metod zastosowanych w poprzedniej publikacji dodatkowo wykonano symulację właściwości ADMET dwoma dostępnymi modelami (ProTox-II i admetSAR) oraz badania wchłaniania komórkowego dla kurkuminy i jej „pegylowanego” odpowiednika. W kolejnym etapie wykonano badania aktywności biologicznej wobec dwóch linii komórek nowotworowych raka pęcherza moczowego (5637 oraz SCaBER) oraz linii komórek prawidłowych MRC-5. Badania cytotoksyczności przeprowadzone w warunkach normoksji i hipoksji pozwoliły na wyselekcjonowanie najbardziej obiecującej struktury „pegylowanej” kurkuminy. Hipoksji w opublikowanym artykule poświęcono bardzo dużo miejsca, jednak to zagadnienie nie znalazło się w celu rozprawy przedstawionym w autoreferacie, a dalej, w opisie do publikacji jest jedynie na ten temat wzmianka. Zagadnienie to wymaga szerszego komentarza. Czy hipoksja jest tu wprowadzona jako czynnik aktywujący prolek do leku, podobnie jak w przypadku promieniowania podczerwonego w metodzie fotodynamicznej?

Doktorant na podstawie badań przeprowadzonych na pochodnych porfiryń i kurkuminy konkluduje, że:

1. Pozycja, w której wprowadzone są łańcuchy ma znaczący wpływ na aktywność biologiczną zarówno w przypadku porfiryń jak i kurkumin.



2. Pozycja łańcucha nie ma znaczącego wpływu na właściwości fotofizyczne porfiryn ani zdolność do generowania tlenu singletowego. Znaczący wpływ na produkcję tlenu singletowego ma natomiast atom w centrum pierścienia makrocyklicznego.
3. „Pegylacja” zmniejsza wchłanianie kurkumin przez błonę komórkową.
4. Łańcuchy PEG mogą zwiększać selektywność kurkumin wobec komórek nowotworowych.
5. „Pegylacja” może zmieniać mechanizm działania kurkumin w kierunku modulacji szlaków aktywnych w hipoksji. Wykazano wzrost ekspresji sześciu białek (HIF-1 α , HIF-2 α , ADAMTS-1, fosfo-JNK, p21 i fosfo-HSP27) po podaniu „pegylowanej” kurkuminy w warunkach hipoksji w porównaniu z niemodyfikowaną kurkumina.

Wnioski są dobrze udokumentowane i wyważone.

Rozprawa doktorska została wykonana w ramach uczestnictwa w projekcie Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie wspólnie przez trzy jednostki: Politechnikę Poznańską, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w ramach Umowy o dofinansowanie nr POWR.03.02.00-00- I011/16. Projekt Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie był współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014 – 2020.

Podsumowanie

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana **mgra farm. Dawida Łażewskiego**, pt. „Polietylenoglikolowe pochodne porfiryn i kurkuminy – synteza oraz ocena właściwości fizykochemicznych i aktywności biologicznej”, ze względu na dojrzałość z jaką została przeprowadzona analiza badanych problemów, sposób ujmowania zagadnień przez Doktoranta, szczegółowość przeprowadzonych badań, a także ich wielopłaszczyznowość, świadczy o opanowaniu przez Pana **mgra farm. Dawida Łażewskiego** metod prowadzenia badań naukowych oraz umiejętności właściwego ich prezentowania. Recenzowana rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie nauki farmaceutycznej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W pełni więc odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim przez art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2022.574 t.j.). Na podstawie tego przepisu wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana **mgra farm. Dawida Łażewskiego** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Toksykologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie


Prof. dr hab. Jarosław Budka