

Prof. UAM Wiesław Prukala
Zakład Chemii Produktów Naturalnych
Wydział Chemii; Uniwersytet im. A. Mickiewicza
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań,

Poznań, 10.03.2023r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. farm. Dawida Łażewskiego,

**pt.: „Polietylenoglikolowe pochodne porfiryń i kurkuminy – synteza oraz
ocena właściwości fizykochemicznych i aktywności biologicznej”**

Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo Kanclerz Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu Pani prof. dr hab. Judyty Cieleckiej-Piontek -(KKN-160/2023; Uchwała nr 9/2023), z dnia 6 lutego 2023 roku.

Przedstawiona praca doktorska Pana mgr. farm. Dawida Łażewskiego została wykonana w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu pod kierunkiem dwóch promotorów: prof. dr. hab. Marka Muriasa i dr. hab. Marcina Wierzchowskiego. Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej były finansowane z projektów OPUS Narodowego Centrum Nauki: OPUS UMO-2021/43/B/NZ7/02476 i OPUS 2019/35/B/NZ7/01156 oraz w ramach uczestnictwa w projekcie *Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBio Tech”* (nr: POWR.03.02.00-00-I011/16) współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014 – 2020. Doktorant brał również udział w projekcie dla młodych naukowców i pracowników nauki UMP nr 502-14-03313427-11039.

Pan mgr Dawid Łażewski ukończył studia na Wydziale Farmacji Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu i otrzymał tytuł magistra farmacji w 2014 roku. Promotorem jego pracy pt.: „Synteza metoksylowych i hydroksylowych pochodnych trans-stilbenu oraz ocena ich wpływu na aktywność aromatazy zależnej od cytochromu P450” był dr n. farm. Marcin Wierzchowski.

Przedstawiona dysertacja celem uzyskania stopnia naukowego doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne składa się z 3 publikacji:

- **Łażewski D.**; Murias M.; Wierzchowski M. Pegylation – in search of balance and enhanced bioavailability. *J Med Sci.* 2022 Dec 30;91(4): e761. (MEiN = 20 pkt) **(P1)**
- **Łażewski D.**; Kucinska M.; Potapskiy E.; Kuzminska J.; Tezyk A.; Popenda L.; Jurga S.; Teubert A.; Gdaniec Z.; Kujawski J.; Grzyb K.; Pedzinski T.; Murias M.; Wierzchowski

M. Novel Short PEG Chain-Substituted Porphyrins: Synthesis, Photochemistry, and In vitro Photodynamic Activity against Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 10029. (IF = 6,208; MEiN = 140 pkt) (P2)

-**Łażewski D.**; Kucinska M.; Potapkiy E.; Kuzminska J.; Popenda L.; Tezyk A.; Goslinski T.; Wierzchowski M.; Murias M. Enhanced Cytotoxic Activity of PEGylated Curcumin Derivatives: Synthesis, Structure–Activity Evaluation, and Biological Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 1467. (IF = 6,208; MEiN = 140 pkt) (P3)

Sumaryczny „Impact Factor” cyklu prac wynosi **12,416**, a suma punktów MEiN – **300**.

Ponadto doktorant jest współautorem dalszych 5-ciu publikacji z listy filadelfijskiej i 6-ciu polskich komunikatów zjazdowych (sumaryczny współczynnik IF **39,202**; liczba punktów MEiN **890**).

Rozprawa doktorska składa się z kilku rozdziałów oraz załączonego cyklu trzech publikacji będącego jej podstawą. Wspólną cechą łączącą te publikacje jest otrzymanie pochodnych porfiryń i kurkumin zawierających łańcuchy glikolu polietylenowego (PEG) oraz wykonanie odpowiednich badań fizykochemicznych oraz biochemicznych.

Na początku swojej pracy doktorant przedstawił swoją aktywność naukową i publikacyjną. W następnym rozdziale „Wstęp” doktorant opisał problemy jakie są spotykane przy projektowaniu nowych leków. Zwrócił uwagę na odpowiednią ich rozpuszczalność w wodzie, przenikalność przez błony komórkowe, stabilność leków modyfikowanych eterem polietylenowym w różnych środowiskach oraz przedstawił wady i zalety różnych metod PEGylacji. Przedstawił również, na podstawie literatury naukowej, zastosowanie modyfikacji eterem polietylenowym (PEG) białek i enzymów oraz tabelę z pegylovanymi lekami zarejestrowanymi przez FDA (str. 16).

W dalszej części „Wstępu” doktorant przedstawił korzystny wpływ jakie wywiera na nośniki leków takie jak liposomy czy nanocząstki, modyfikacja eterem polietylenowym. Przedstawił również podstawy terapii fotodynamicznej (PDT) oraz badania nad wprowadzaniem łańcucha PEG do fotouczulaczy (fotosensybilizatorów) i związane z tym zagadnieniem problemy: wpływ długości oraz ilości w cząsteczce łańcuchów PEG na przenikanie przez błony komórkowe, stabilność oraz aktywność fotosensybilizatorów. W rozdziale tym przedstawiony jest także możliwy wpływ wprowadzonych łańcuchów PEG do leków małowcząstkowych w klasycznych terapiach. Przykładem mogą być pegylowane pochodne: kamptotecyny, decetakselu, doksorubicyny, naloksolu czy też acyklowiru i gentamycyny. Rozdział ten kończy się analizą problemów do rozwiązania, jakie pojawiają się przy projektowaniu leków zawierających łańcuchy polietylenowe PEG. Jest on dobrze udokumentowany literaturą naukową.

W moim odczuciu doktorant w tej części pracy nie ustrzegł się jednak pewnych nieprawidłowości:

-str. 10 „Jestem autorem 8 publikacji....

-str. 17 „PEG o masach molowych w zakresie 2-5 kDa.....

-str. 22 ‘...zmniejszona zdolność do penetracji błon komórkowych []....- brak odnośnika lit.

W następnym rozdziale „Cel pracy” Pan mgr Dawid Łażewski przedstawił w sposób jasny i spójny główne założenia swojej pracy:

- syntezę aldehydów zawierających krótkie łańcuchy PEG

-synteza i izolacja porfiryn i ich kompleksów z wybranymi metalami i zawierającymi krótkie łańcuchy PEG

-ocena wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego oraz aktywności fotodynamicznej przeciwko komórkom nowotworowym otrzymanych pochodnych porfiryn

-syntezę i izolację pegylowanych kurkumin i ich kompleksów z difluoroborem

- ocena ich aktywności cytotoksycznej przeciwko komórkom nowotworowym

Otrzymane związki zostały nazwane zgodnie z regułami IUPAC oraz przedstawione na rys. 1 (str. 25). W tym rozdziale chciałbym zwrócić uwagę na drobne „niedociągnięcia”:

- str. 24 pkt. 2 i pkt. 4 – niepoprawna składnia zdań

- str. 26 na rys. 1 brak schematu otrzymywania 3,5-dimetoksy-4-(1,4,7,10-tetraoksoundecylo)-benzaldehydu

W następnym rozdziale Pan mgr Dawid Łażewski omawia publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.

W pierwszej publikacji stanowiącej część dysertacji ((P1) J. Med. Sci. 2022 Dec 30;91(4): e761) udział doktoranta polegał na przeglądzie literatury dotyczącej tematyki pegylacji, przygotowaniu manuskryptu oraz przygotowaniu rysunków. W artykule zwrócono uwagę na jeden z największych problemów związanych z projektowaniem nowych leków- na ich słabą biodostępność. Na to składa się rozpuszczalność i przenikalność przez błony komórkowe. Glikol polietylenowy jest substancją o właściwościach amfifilowych i od lat wykorzystywany jest do modyfikacji struktury związków aktywnych w celu zwiększenia ich rozpuszczalności. Zwrócono uwagę na wykorzystanie głównie łańcuchów PEG o masie kilku a nawet kilkudziesięciu kDa. Opisano metody łączenia PEG z modyfikowanymi cząsteczkami oraz najczęstsze rodzaje wiązań do tego wykorzystywanych. Przedstawiono problem jakim może być pojawienie się przeciwciał skierowanych przeciwko PEG oraz duży rozkład mas cząsteczkowych, zwłaszcza przy długich łańcuchach i problemy z separacją poszczególnych izomerów takich związków podczas procesu syntezy. Artykuł zawiera bardzo bogatą literaturę i stanowi świetne wprowadzenie w tę tematykę.

Jednakże, jako recenzent zauważyłem, że w tym artykule na:

-str. 319 Fig. 5., jeden ze schematów przedstawiający pochodną kurkuminy nie ma nazwy i przypisanego odnośnika literaturowego

W drugiej publikacji stanowiącej część dysertacji ((P2). Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 10029) udział doktoranta w tej pracy polegał na syntezie badanych związków, ich charakterystyce spektralnej i opisanu struktury, analizie widm i wyników, wykonaniu pomiarów generowania tlenu singletowego oraz przygotowaniu manuskryptu.

W pierwszym etapie zsyntezowano aldehydowe prekursory zawierające łańcuch PEG oraz potwierdzono ich strukturę badaniami fizykochemicznymi. Następnie dokonano syntezy sześciu porfiryn zawierających krótkie łańcuchy PEG w pozycjach *meta* i *para* pierścienia fenyłowego, z czego cztery związki były kompleksami metali (2 kompleksy cynku(II) i 2 kompleksy kobaltu(II)). Czystość uzyskanych związków potwierdzono techniką HPLC. Następnie wykonano pomiary wydajności generowania tlenu singletowego wykorzystując 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.

Przeprowadzone badania wykazały pozytywny wpływ łańcucha PEG na aktywność biologiczną badanych związków oraz ich właściwości fizykochemiczne. Modyfikacja nie wpłynęła na właściwości spektralne badanych porfiryn. Znacząco zwiększyła natomiast rozpuszczalność w środowisku wodnym.

Praca zawiera olbrzymią ilość materiału doświadczalnego wraz z dobrze potwierdzoną strukturą otrzymanych związków organicznych. Jednakże w świetle doniesień literaturowych:

-absorpcja przez te związki promieniowania o długości fali $\lambda_{\max}=425\text{nm.}$, ze względu na jego małą zdolność do penetracji tkanek, nie jest zbyt atrakcyjna w terapii fotodynamicznej.

W trzeciej publikacji stanowiącej część dysertacji ((P3) Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 1467) udział doktoranta w pracy polegał na syntezie badanych związków, ich charakterystyce spektralnej i opisanu struktury, analizie widm i wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

W publikacji opisano syntezę trzech kurkuminowych kompleksów difluoroboranowych oraz dwóch wolnych kurkumin zawierających krótkie łańcuchy PEG składające się z trzech jednostek glikolu w pozycjach *meta* i *para* pierścienia fenyłowego. Podano ich charakterystykę fizykochemiczną, symulacje właściwości ADMET (absorpcja, dystrybucja, metabolizm, eliminacja, toksyczność) oraz badania aktywności cytotoksycznej na liniach komórkowych. Przeprowadzono badania porównawcze mające wyjaśnić wpływ wprowadzenia łańcuchów PEG na aktywność biologiczną kurkumin.

Udowodniono iż:

- petylacja zmniejsza wchłanianie kurkumin przez błonę komórkową (dwukrotnie).

- łańcuchy PEG mogą zwiększać selektywność kurkumin wobec komórek nowotworowych. Pegylowana kurkumina wykazała silniejsze działanie cytotoksyczne przeciwko komórkom rakowym, a jednocześnie nie działała toksycznie przeciwko komórkom prawidłowym w badanym zakresie stężeń.

- 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.

Podsumowanie

Rozprawę doktorską pana mgr Dawida Łażewskiego oceniam bardzo wysoko. Uważam ją za niezwykle ciekawą, nowatorską, mającą potencjał aplikacyjny i spełniającą wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz. 574 ze zm.)

Z przedstawionych publikacji wynika, że doktorant brał udział w pracach nad syntezą związków organicznych należących do różnych klas i o odmiennej strukturze przestrzennej (pochodne: stilbenów, porfiryń, ftalocyjanin czy też kurkumin). **Zatem świadczy to, że potrafi zdefiniować cel pracy badawczej, przeanalizować dostępny zasób wiedzy z publikacji naukowych i wyciągnąć właściwe wnioski oraz przeprowadzić stosowne eksperymenty badawcze zakończone sukcesem.**

W przedstawionym cyklu publikacji, będącego podstawą rozprawy doktorskiej, jest współautorem umieszczonym na pierwszym miejscu- co świadczy o jego dominującym wkładzie w ich powstanie. Dwie z tych publikacji w formie oryginalnych prac są opublikowane w czasopismach naukowych o liczbie punktów MEiN =140 (oraz 3 publikacje o liczbie punktów MEiN=140 będące w ogólnym dorobku naukowym doktoranta). Wysoki poziom pracy, a także dorobek publikacyjny Doktoranta, są podstawą do mojego wniosku o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

