

dr hab. n. farm. Bartosz Wielgomas, prof. uczelni

Gdańsk, 06 marca 2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. farm. Dawida Łażewskiego,  
pt.: „Polietylenoglikolowe pochodne porfiryn i kurkuminy – synteza oraz  
ocena właściwości fizykochemicznych i aktywności biologicznej”**

Niniejsza recenzja została sporządzona w odpowiedzi na pismo (KKN-160/2023) prof. dr hab. Judyty Cieleckiej-Piontek - Kanclerz Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, z dnia 6 lutego 2023 roku.

Praca doktorska została oceniona pod kątem spełnienia kryteriów wskazanych w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska 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 Wierchowskiego. Realizacja pracy doktorskiej wspierana była finansowo z wielu źródeł: dwóch projektów OPUS Narodowego Centrum Nauki a także projektu Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech” współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014 – 2020.

Na rozprawę na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, składa się cykl 3 publikacji, z czego pierwsza jest pracą przeglądową (P1) a dwie kolejne są pracami oryginalnymi (P2 i P3).

- Łażewski D.; Murias M.; Wierchowski 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.; Potapkiy E.; Kuzminska J.; Tezyk A.; Popena L.; Jurga S.; Teubert A.; Gdaniec Z.; Kujawski J.; Grzyb K.; Pedziński T.; Murias M.; Wierchowski 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.; Popena L.; Tezyk A.; Goslinski T.; Wierchowski 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

Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania Impact Factor wynosi 12,416 a suma punktów MEiN – 300.

Rozprawa doktorska ma formę wydruku komputerowego, w którym Doktorant na 38 stronach przedstawił swój życiorys naukowy, osiągnięcia publikacyjne, udział w konferencjach naukowych i projektach badawczych. Głównym elementem rozprawy jest jednak syntetyczny opis przedmiotu badań, będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora. Autor rozprawy sprawnie wprowadza czytelnika w tematykę swoich badań, określa celowość podjętych zadań badawczych, definiuje poszczególne etapy eksperymentalne wraz ze wskazaniem narzędzi, którymi posłużył się do odpowiedzi na postawione hipotezy. W dalszej części omawia poszczególne publikacje wchodzące w skład cyklu i przedstawia skondensowane wnioski, wykaz literatury oraz streszczenie w języku angielskim, którego obecność jest wymagana art. 187 wspomnianej wyżej Ustawy. Drugą częścią rozprawy, znacznie większą objętościowo, są przedruki publikacji wraz z materiałami uzupełniającymi. Na końcu znajdują się oświadczenia współautorów publikacji.

Celem rozprawy była synteza pochodnych porfiryn i kurkumin (w tym ich kompleksów z metalami) zawierających jednostki glikolu polietylenowego (PEG), ich identyfikacja, charakterystyka spektralna, określenie wydajności generowania tlenu singletowego i oszacowanie aktywności cytotoksycznej wobec komórek nowotworowych, również w wariancie terapii fotodynamicznej.

Chcąc wypełnić sumiennie obowiązki recenzenta, pozwalam sobie na kilka uwag do pierwszej części rozprawy:

- W sekcji „Nośniki leków” Doktorant stwierdza, że „do tego typu zastosowań nadają się PEG o masach molowych w zakresie 2-5 kDa”. Należałoby w tym miejscu użyć pojęcia masa cząsteczkowa a nie molowa, do wyrażenia której używamy jednostki g/mol.
- „Czas krążenia w organizmie” nie jest parametrem farmakokinetycznym, aczkolwiek spotyka się to określenie w języku angielskim jako „circulation time”. W języku polskim należałoby zastąpić biologicznym okresem półtrwania.
- Wyrażenie „cząsteczki pochłaniające światło...” należałoby zastąpić „cząsteczki pochłaniające promieniowanie...”.

W kolejnym rozdziale Autor omawia skrótowo zawartość poszczególnych publikacji. Pierwsza praca z cyklu (P1) jest pracą przeglądową opublikowaną w Journal of Medical Science. Doktorant jest pierwszym autorem. We wstępie przedstawia problemy rozpuszczalności oraz transportu substancji leczniczych przez błony komórkowe, czyli cech mających kluczowe znaczenie dla biodostępności. Kolejno wprowadza czytelnika w tematykę modyfikacji cząsteczki substancji leczniczej zmierzających do poprawy niekorzystnych właściwości fizykochemicznych,

determinujących los w organizmie i stabilność. Dokonuje przeglądu i omawia poszczególne sposoby przyłączania cząsteczki/ek glikolu polietylenowego do substancji leczniczej oraz przedstawia wady i zalety poszczególnych rozwiązań. W dalszej części odnosi się do zastosowania tej techniki w kontekście białek i enzymów a także modyfikacji nośników, takich jak liposomy czy nanocząstki. Przytacza przykłady dopuszczonych do obrotu produktów leczniczych zawierających w swoim składzie substancje czynne modyfikowane PEG lub zawierające nośniki PEG. Dużo uwagi poświęca terapii fotodynamicznej i możliwości zastosowania w tym wypadku modyfikacji PEG do zwiększenia rozpuszczalności i zwiększenia stabilności oraz biodostępności substancji leczniczych. Autor omawia też ograniczenia tej technologii w kontekście leków niskocząsteczkowych i wymienia listę problemów do rozwiązania oraz pytań, na które należy uzyskać odpowiedź w kontekście dalszego wykorzystania procesu pegylacji.

W publikacji P2 Doktorant zsyntezował pochodne porfiryne zawierające krótkie łańcuchy PEG (3 jednostki), które zostały następnie bardzo dobrze scharakteryzowane spektralnie (UV-Vis,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MALDI-TOF). W tym miejscu warto podkreślić, że Doktorant do identyfikacji wszystkich uzyskanych związków wykorzystywał techniki o najwyższej wiarygodności a przedstawiona, bogata dokumentacja jest tego dowodem. W kolejnym kroku Doktorant porównał eksperymentalne widma absorpcyjne z symulowanymi w programie Gaussian 09, stwierdzając ostatecznie „zaskakująco spójne wyniki” pomiędzy doświadczalnymi i symulowanymi. Uzyskane związki posiadają maksima absorpcji w okolicach 425 nm, co sprawia, że wymagałyby zastosowania technologii dostarczających promieniowanie do tkanki docelowej, gdyż w tym zakresie długości fali promieniowania zdolność penetracji tkanek jest bardzo ograniczona.

Aktywność przeciwnowotworową badano testem MTT z wykorzystaniem trzech linii nowotworowych: pęcherza moczowego (5637), gruczołu krokowego (LNCaP) i czerniaka (A375). Uzyskane pochodne były aktywne wobec komórek raka pęcherza moczowego i gruczołu krokowego, natomiast linia czerniaka wykazywała się największą opornością na działanie nowych pochodnych. Aktywność cytotoksyczna korelowała ze zdolnością poszczególnych związków do wytwarzania tlenu singletowego. Doktorant tłumaczy w dyskusji, że oporność komórek czerniaka nie jest konsekwencją wysokiej produkcji melaniny, ale bardzo wysoką aktywnością układów antyoksydacyjnych. Innym zagadnieniem diskutowanym w pracy jest wpływ pozycji podstawienia PEG w cząsteczce na aktywność biologiczną. Dodatkowo, Doktorant wykazał, że najsilniejsze działanie przeciwnowotworowe wykazują pochodne cynkowe oraz wolne porfiryne, natomiast porfiryne zawierające kobalt w niewielkim stopniu generują tlen singletowy a co za tym idzie, charakteryzują się niską aktywnością biologiczną. Wszystkie z testowanych związków wykazywały aktywność pod wpływem naświetlania natomiast nie były cytotoksyczne bez naświetlania.

W ostatniej publikacji cyklu (P3) Doktorant przedstawił wyniki badań, których celem była synteza pochodnych kurkuminy oraz ocena właściwości fizykochemicznych, ocena losu substancji w organizmie i toksyczności (ADMET) oraz ostatecznie badania aktywności cytotoksycznej. Modyfikacje strukturalne obejmowały wprowadzenie ugrupowania difluoroboranowego oraz

pegylacja pierścieni fenyloyowych w pozycjach *meta* i *para*. Aktywność cytotoksyczną badano wobec dwóch linii komórek nowotworowych raka pęcherza moczowego (5637 oraz SCaBER) oraz jednej linii komórek prawidłowych MRC-5. Badania aktywności biologicznej przeprowadzono w warunkach normoksji oraz hipoksji. Działanie cytotoksyczne w znaczącym stopniu zależało od obecności ugrupowania BF<sub>2</sub>, jednak obserwowano niską selektywność wobec komórek nowotworowych. Co ciekawe, wprowadzenie łańcuchów PEG poprawiało selektywność, ale nie zwiększało przenikania do wnętrza komórek. W dalszych badaniach wykazano zależność wielkości przenikania do komórek od obecności bydłcej surowicy płodowej. Badania z wykorzystaniem cytometrii przepływowej pozwoliły z kolei na wskazanie, że pegylowana kurkumina hamuje cykl komórkowy w fazie G2/M. Dodatkowo, w warunkach hipoksji, związek 5 indukował ekspresję wielu białek i czynników związanych ze stresem i niedotlenieniem.

Doktorant ostatecznie sformułował 5 wniosków, będących podsumowaniem prac eksperymentalnych. Badania pozwoliły na wskazanie najkorzystniejszego z punktu widzenia aktywności biologicznej miejsca przyłączenia łańcucha PEG w pierścieniach fenyloyowych, porfiryn (*meta*) oraz kurkuminy (*para*). Co ciekawe, pozycja łańcucha PEG nie wpływała na zdolność do generowania tlenu singletowego a najbardziej aktywne w tym aspekcie były wolne porfiryny.

Modyfikacja kurkumin poprzez pegylację prowadziła do zmniejszenia przenikania do wnętrza komórek. Jedna z pegylowanych pochodnych kurkumin wykazywała się wyższą aktywnością przeciwnowotworową zachowując przy tym pożądaną selektywność wobec komórek nieprawidłowych. Kurkuminy modyfikowane PEG wpływały na ekspresję szeregu białek aktywnych w warunkach niedoboru tlenu.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie nauk farmaceutycznych, gdyż dotyczy poszukiwania nowych substancji czynnych o potencjale terapeutycznym, czyli jest to jeden z kluczowych obszarów badawczych w farmacji. Publikacje wchodzące w skład cyklu są dowodem na to, że Doktorant posiadał wystarczającą wiedzę, która pozwoliła mu na zaplanowanie, przeprowadzenie badań oraz interpretację uzyskanych wyników i przekonanie do nich niezależnych recenzentów czasopism naukowych.

Doktorant przeprowadził szereg badań, których wyniki świadczą o Jego umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a na podkreślenie zasługuje umiejętność współpracy ze specjalistami różnych dziedzin oraz integracja wielu ścieżek badawczych i wniosków z nich płynących. Oświadczenia współautorów publikacji dowodzą, że Doktorant pełnił wiodącą rolę w ich powstaniu.

Rozprawa doktorska mgr. farm. Dawida Łażewskiego stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Uzyskane przez Niego wyniki mają dużą wartość poznawczą i mogą być wykorzystane do planowania kolejnych badań.

**Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi ustawowe stawiane kandydatom do stopnia doktora i wnioskuje do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr. farm. Dawida Łażewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Katedra i Zakład Toksykologii  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
dr hab. Bartosz Wielgomas, prof. uczelni  
  
Kierownik