



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYczNY

KATEDRA I ZAKŁAD TECHNOLOGII LEKÓW
I BIOTECHNOLOGII FARMACEUTYCZNEJ

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr farm. Pawła Bakuna
p.t. „Synteza i charakterystyka fizykochemiczna modyfikowanych polifenoli
o potencjalnym zastosowaniu w medycynie i farmacji”,
wykonanej w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Promotor: prof. dr hab. Tomasz Gośliński
Promotor pomocniczy: dr hab. Tomasz Koczorowski

Celem badań stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej pana mgr Pawła Bakuna było otrzymanie nowych pochodnych lub postaci związków z grupy polifenoli należących do podgrup flawonoidów i kurkuminoidów o zoptymalizowanych własnościach fizykochemicznych oraz wysokiej cytotoksyczności w stosunku do komórek nowotworowych i niektórych szczepów patogennych bakterii. Prowadzone badania wpisują się w całości w zakres dziedziny nauk medycznych i o zdrowiu, dyscypliny nauk farmaceutycznych.

Ocena celowości podjęcia tematyki badawczej

Poddawane przez Doktoranta modyfikacjom naturalne polifenole są związkami niezwykle interesującymi z punktu widzenia potencjalnego zastosowania w leczeniu: są aktywnymi antyoksydantami, działają przeciwzapalnie, spazmolitycznie, wykazują też działanie przeciwnowotworowe oparte o wpływ na szlaki sygnałowe w komórkach, niektóre wykazują wysokie powinowactwo do ugrupowań hydroksylowych i karboksylowych białek. Będące obiektem badań Doktoranta pochodne kwasu galusowego, w tym galusan epigalokatechiny (EGCG), wykazują działanie przeciwbakteryjne a także hamują proliferację komórek nowotworowych oraz indukują ich apoptozę. Innym polifenolem stanowiącym dla Doktoranta strukturę wiodącą w projektowaniu nowych związków o działaniu przeciwnowotworowym jest kurkumina - przedstawiciel grupy kurkuminoidów, również

MT

wykazująca wielokierunkowe działanie o opisanym powyżej profilu. Zastosowanie naturalnych polifenoli w leczeniu ograniczają jednak ich niekorzystne własności fizykochemiczne i niska stabilność. Biorąc to pod uwagę, Doktorant w swoich badaniach podjął się modyfikacji struktury naturalnych polifenoli, mającej na celu uzyskanie związków o wyższej aktywności przeciwnowotworowej i przeciwbakteryjnej, przy równoczesnej wyższej biodostępności. Obydwa kierunki zaprojektowanych badań uważam za aktualne i w pełni uzasadnione.

Ocena układu rozprawy doktorskiej oraz zastosowanego piśmiennictwa

Recenzowana dysertacja oparta jest na cyklu 4 publikacji z lat 2022-2024 opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR o sumarycznym wskaźniku IF= 16,2 (punktacja MNISW= 520). Jedną z prac jest praca przeglądowa tematycznie związana z kierunkiem badań eksperymentalnych Doktoranta, pozostałe 3 to prace oryginalne. We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym, co świadczy o jego wiodącym udziale w ich powstawaniu. Cykl publikacji Doktorant zaopatrzył w 28 stronicowy komentarz zawierający wstęp teoretyczny uzasadniający podjęcie badań, analizę założeń rozprawy, omówienie osiągnięć badawczych w kolejnych pracach wchodzących w skład cyklu, podsumowanie wyników i wnioski, przegląd piśmiennictwa oraz streszczenie w języku angielskim i polskim. Załączony przegląd piśmiennictwa obejmuje 38 pozycji, w wysokim procencie opublikowanych w okresie ostatnich lat. Stanowi on, wraz z piśmiennictwem cytowanym w publikacjach na których oparta jest dysertacja, czytelną podstawę dla założeń pracy. Autor dołączył również kopie artykułów wchodzących w skład cyklu, pisemne oświadczenia współautorów oraz orzeczenia komisji bioetycznych.

Podsumowując stwierdzam, że układ pracy jest czytelny a cel badawczy oparty o szeroką analizę najnowszego piśmiennictwa.

Analiza zastosowanych metod badawczych i uzyskanych wyników

Ze względu na szeroki zakres pracy i zróżnicowane cele badań w kolejnych jej etapach, metodologia zastosowana przez Doktoranta jest również w kolejnych etapach różna. Najbardziej czytelne będzie w mojej ocenie omówienie jej w odniesieniu do kolejnych prac tworzących cykl.

Ogólne cele badań opisanych w 3 publikacjach oryginalnych są spójne, niemniej biorąc pod uwagę dwie różne grupy polifenoli poddawanych modyfikacji i stosowane w tym celu różne metodyki, nasuwa się wniosek, że w analizowanej dysertacji mieszczą się dwie możliwe do wydzielenia części: pierwsza obejmuje modyfikacje struktury pochodnych kwasu galusowego i galusanu epigalokatechiny (publikacje 1 i 2), druga - modyfikacje struktury kurkuminy (publikacje 3 i 4).

Publikacja 1.

W pierwszej publikacji z cyklu opisano osadzenie polifenolu – kwasu galusowego na powierzchni nanocząstek tlenku tytanu(IV). Celem było uzyskanie materiału o działaniu przeciwbakteryjnym. Uzyskany nanomateriał został dokładnie scharakteryzowany metodami fizykochemicznymi, a następnie zbadany pod kątem toksyczności i aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Otrzymane nanocząstki TiO_2 sfunkcjonalizowane kwasem galusowym (GA) będące nowym nanomateriałem (TiO_2 -GA) scharakteryzowano kilkoma metodami: skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), analizy wielkości nanocząstek (NTA), rentgenowskiej dyfraktometrii proszkowej (XRPD), spektroskopii w podczerwieni (IR) i Ramana oraz termogravimetrii (TGA). Przeprowadzono również testy właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych: test właściwości przeciwutleniających DPPH, test toksyczności ostrej Microtox[®], test cytotoxyczności MTT wobec linii komórkowej prawidłowej fibroblastów ludzkich MRC-5 pd19, a także ocenę cytotoxyczności względem 3 gatunków mikroorganizmów (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*). Celem określenia działania fotocytotoxycznego materiału, przeprowadzono także dodatkowe testy z ekspozycją na światło widzialne przy długości fali λ_{max} 425 nm.

W wyniku prowadzonych badań uzyskano i scharakteryzowano nowy nanomateriał (TiO_2 -GA) który w teście Microtox[®] w stężeniach do 0,1% wykazał brak toksyczności ostrej, w teście DPPH wykazał znaczące właściwości przeciwutleniające, powodował znaczny spadek przeżywalności komórek bakteryjnych *S. aureus* poddanych działaniu światła o długości fali 425 nm. Cytotoxyczność TiO_2 -GA *in vitro* oceniona testem MTT na hodowli ludzkich fibroblastów była niższa niż GA.

Publikacja 2.

W drugiej z cyklu publikacji poddano analizie sposoby modyfikacji chemicznej modelowego polifenolu – galusanu epigallokatechiny i ich wpływu na aktywność biologiczną tego związku. Z analizy piśmiennictwa wynika, że w wyniku modyfikacji cząsteczki EGCG możliwe jest uzyskanie pochodnych wykazujących wyższą aktywność biologiczną niż związek wyjściowy, w czym mieszczą się właściwości przeciwzapalne, przeciwutleniające, przeciwdrobnoustrojowe i przeciwnowotworowe. Autor opisał również synergizm działania pochodnych EGCG z cytostatykami takimi jak pEGCG i cisplatyna, a także zdolności tych związków do odwrócenia

PTM

oporności wielolekowej. Omawiana publikacja przeglądowa jest uzasadnieniem zainteresowania Doktoranta pochodnymi polifenoli, w tym galusanu epigalokatechiny

Publikacja 3.

W trzecim artykule opisano syntezę i charakterystykę serii 30 związków chemicznych inspirowanych strukturą chemiczną kurkuminy. Otrzymane nowe związki zostały szczegółowo scharakteryzowane fizykochemicznie oraz poddane badaniom aktywności przeciwnowotworowej. Nowe pochodne polifenolowe otrzymano z wysoką wydajnością stosując klasyczne i mikrofalowe metody syntezy, a następnie poddano charakterystyce fizykochemicznej metodami: NMR, HRMS, HPLC, UV-VIS, TLC i przez pomiar temperatury topnienia. Nowe związki poddano testom aktywności biologicznej: toksyczność ostrą określono za pomocą testu Microtox®, ocenę aktywności metabolicznej przeprowadzono w teście MTT na liniach komórkowych ludzkiego nowotworu pęcherza moczowego a także wychwyty w oparciu o posiadane przez nie właściwości fluorescencyjne. Analiza wyników badań biologicznych wykazała, że otrzymane symetryczne kurkuminoidy charakteryzują się wyższą aktywnością przeciwnowotworową niż quasi-kurkuminoidy. Wykazano również, że modyfikacja motywu β -diketonu w macierzystym związku – kurkuminie z użyciem grupy difluoroboranowej (BF_2) zwiększa efekt cytotoksyczny. Autor wyraźnie stwierdza, że wyniki badań powinny stanowić podstawę do zaprojektowania dalszych badań prowadzących do poznania wewnątrzkomórkowego mechanizmu działania najaktywniejszych związków i oceny ich aktywności biologicznej *in vivo*.

Publikacja 4

W czwartej publikacji wchodzącej w skład cyklu będącego podstawą dysertacji opisana została synteza, badania własności fizyko-chemicznych oraz aktywności biologicznej nowej czwartorzędowej amoniowej pochodnej kurkuminy. Związek został zaprojektowany do zastosowań w terapii fotodynamicznej skierowanej przeciwko drobnoustrojom (APDT). Przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna APDT opiera się na mechanizmie fizykochemicznym w którym dochodzi do generowania reaktywnych form tlenu i rodników, co przykłada się na wielokierunkowe efekty wewnątrzkomórkowe. Otrzymaną pochodną kurkuminy z ugrupowaniami typu czwartorzędowych soli amoniowych (jodków N-metylomorfolinioetoksylowych) oceniono pod względem fotostabilności, generowania tlenu singletowego, agregacji i toksyczności ostrej wobec prokariotycznych komórek *Aliivibrio fischeri* w teście Microtox®. Zbadano również wpływ związku na aktywność metaboliczną komórek eukariotycznych w teście MTT z użyciem wybranych ludzkich linii komórkowych: komórek

YTC

nowotworu skóry, prawidłowych fibroblastów płucnych oraz pierwotnych fibroblastów skóry ludzkiej. Wstępne badania określające fotocytotoksyczność, a tym samym potencjalną użyteczność w terapii APDT, przeprowadzono z wykorzystaniem kilku wzorcowych szczepów drobnoustrojów. Badania wykazały, że nowa pochodna kurkuminy jest potencjalnym fotosensybilizatorem w terapii APDT ukierunkowanej przeciw bakteriom, nie wykazuje natomiast aktywności wobec grzybów. Godna uwagi jest wysoka aktywność badanego związku przeciwko szczepowi *P. aeruginosa* wysoce opornemu na różne antybiotyki oraz na środki dezynfekujące i antyseptyczne. Badania testem MTT wykazały, że badany związek nie wywiera toksycznego wpływu na prawidłowe ludzkie linie komórkowe, ani na testowane nowotworowe linie. Reasumując, badany związek wykazuje interesujący potencjał antybakteryjny i powinien być brany pod uwagę w projektowaniu dalszych badań. Zgadzam się z Autorem, że wskazane są dalsze szczegółowe testy, które pozwoliłyby dokładniej zrozumieć mechanizm działania nowej pochodnej, a także sprawdzić, czy obserwowana aktywność jest także ukierunkowana przeciwko innym szczepom drobnoustrojów.

Podsumowując, Doktorant w swojej pracy zastosował szeroki zakres zaawansowanych metod badawczych z zakresu zarówno syntezy nowych związków o spodziewanej aktywności farmakologicznej, badania struktury molekuł zaawansowanymi metodami fizykochemicznymi jak też badań aktywności biologicznej otrzymanych związków. Na uznanie zasługuje zarówno zdolność do zastosowania tych metod w praktyce, jak i umiejętność analizy uzyskanych wyników.

Uwagi na temat całkowitego dorobku naukowego Doktoranta

Z uznaniem stwierdzam, że całkowity dorobek naukowy Doktoranta jest bardzo znaczący: współautorstwo 15 publikacji (w tym również publikacji z pierwszym autorstwem) o łącznym IF=51,227, 12 doniesień zjazdowych, staże naukowe krajowe i zagraniczne, udział w realizacji 4 projektów, w tym jednego finansowanego przez NCN, indeks H=5. Dorobek tego typu byłby w zasadzie wystarczający do otwarcia postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego – oczywiście gdyby dotyczył osoby posiadającej już stopień naukowy doktora.

Uwagi krytyczne i zagadnienia wymagające dodatkowego wyjaśnienia przez Doktoranta

Recenzując dysertację odniosłam wrażenie, że pomimo wspólnego nadrzędnego celu prowadzenia badań w grupie pochodnych flawonoidów i w grupie kurkuminoidów, różnica w podejściu do problemu i zróżnicowanie stosowanych metodyk dla publikacji 1 i 2 oraz 3 i 4 powoduje pewną niejednorodność dysertacji. Chciałabym prosić Doktoranta o wyjaśnienie,

dlaczego zdecydował się na włączenie obydwu tych wątków badań do swojej rozprawy. Nie było to konieczne dla poszerzenia materiału badawczego objętego rozprawą, ponieważ obydwa te wątki mogłyby z powodzeniem stanowić podstawę niezależnych dysertacji.

Chcę również zapytać, czy Doktorant widzi celowość prowadzenia dalszych poszukiwań aktywnych cytostatyków w grupie pochodnych kurkuminy, a jeżeli tak – jakie widzi możliwości dalszej modyfikacji struktury.

Podsumowanie

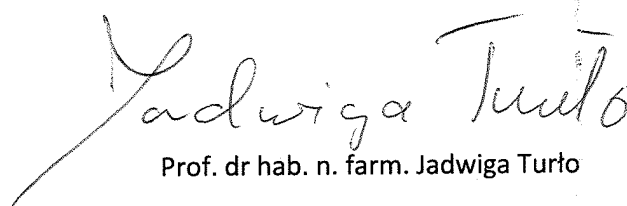
Podsumowując pragnę stwierdzić, że pan mgr Paweł Bakun przedłożył wartościową pracę, wnoszącą istotny wkład do wiedzy na temat zależności działania – budowa pochodnych polifenoli, w szczególności pochodnych kwasu galusowego i kurkuminy o działaniu cytotoksycznym oraz przeciwdrobnoustrojowym, jak również ich stabilności.

Doktorant wykazał się szeroką wiedzą teoretyczną dotyczącą dyscypliny w zakresie której prowadzi badania naukowe, umiejętnością przeprowadzenia złożonych eksperymentów związanych zarówno z syntezą chemiczną jak i badaniem aktywności substancji farmakologicznie czynnych. Wykazał również wysokie kompetencje w zakresie analizy otrzymanych wyników oraz formułowania wniosków. Rozprawa pana mgr Pawła Bakuna w mojej ocenie stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, ma również istotne aspekty aplikacyjne.

W mojej ocenie rozprawa doktorska pana mgr Pawła Bakuna spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. 2023 poz. 742), w związku z czym zwracam się do Kapituły Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu z wnioskiem o nadanie mgr Pawłowi Bakunowi stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk farmaceutycznych.

Biorąc pod uwagę wysoki poziom recenzowanej pracy, szczególne walory poznawcze i aplikacyjne, oryginalność i złożoność stosowanych metod badawczych, oraz wysoki całkowity dorobek naukowy doktoranta zwracam się do Wysokiego Kolegium z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy.

Warszawa 14 lutego 2025


Prof. dr hab. n. farm. Jadwiga Turło