

Kraków, 21.02.2025

UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE



Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Farmaceutycznej
30-688 Kraków, ul. Medyczna 9
Tel. +48 12 620 54 50

Kierownik – prof. dr hab. Marcin Kołaczowski

RECENZJA

rozprawy doktorskiej p.t. "Synteza i charakterystyka fizykochemiczna modyfikowanych polifenoli o potencjalnym zastosowaniu w medycynie i farmacji", wykonanej przez mgr farm. Pawła Bakuna, absolwenta studiów doktoranckich w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, pod kierunkiem prof. dr. hab. Tomasza Goślińskiego oraz dr. hab. Tomasza Koczorowskiego

Recenzja została opracowana na zlecenie Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, w oparciu o art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (z późn. zm.), dotyczący wymagań stawianym rozprawom doktorskim.

Rozprawa doktorska mgr Pawła Bakuna została przedstawiona w postaci pracy pisemnej, stanowiącej zbiór czterech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów, opatrzony opisem scalającym, umieszczającym przedstawiane badania w kontekście awansu doktorskiego. Tym samym można stwierdzić, że niniejsza rozprawa **jest zgodna z wymaganiami ustawowymi dotyczącymi formy rozprawy doktorskiej (art. 187 pkt. 3)**. Co więcej, należy podkreślić, że taka forma rozprawy doktorskiej wychodzi naprzeciw nowoczesnym trendom i stanowi wartość dodaną. Wskazuje bowiem, że badania tam opisane zostały już przyjęte i pozytywnie zrecenzowane, co stanowi potwierdzenie ich istotności dla społeczności naukowej. Godne uznania, szczególnie biorąc pod uwagę relatywnie wczesny etap kariery naukowej, są parametry

naukometryczne cyklu publikacji. Został on ogłoszony w czasopiśmie o łącznym współczynniku Impact Factor wynoszącym 16,2 oraz punktacji MNiSW równej 520. Jako że przedmiotowe publikacje mają charakter wieloautorski, zgodnie z wymaganiami, do rozprawy dołączone zostały oświadczenia o wkładzie poszczególnych naukowców w powstanie tych artykułów. Oświadczenia współautorów są zgodne i nie pozostawiają wątpliwości co do wiodącej roli Doktoranta. Co istotne, polegała ona nie tylko na wykonaniu dużej części prac, ale także, wspólnie z promotorem, na ich zaplanowaniu, a następnie odpowiedniej interpretacji otrzymanych wyników. Wkład Doktoranta jest więc nie tylko wiodący pod względem ilościowym, ale co najważniejsze, ma charakter typowo naukowy, właściwy poziomowi doktorskiemu. Można więc stwierdzić, że Doktorant **wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, co stanowi bardzo istotny przyczynek do spełnienia wymogów zawartych w art. 187, pkt. 1.**

Oparcie pracy na załączonych publikacjach wpłynęło na jej objętość, a także sposób przedstawienia treści zawartych w opisie scalającym zbiór publikacji. Całość pracy pisemnej stanowi 159 stron, z czego oryginalny, nie wchodzący w skład opublikowanych artykułów opis scalający, stanowi 39 stron. Proporcja taka jest jak najbardziej zasadna, zważywszy na zawarcie wielu informacji, szczególnie o charakterze metodycznym, w załączonych publikacjach.

Publikacja przeglądowa (oznaczona numerem 2), zatytułowana „Tea-break with epigallocatechin gallate derivatives – Powerful polyphenols of great potential for medicine”, opublikowana została w czasopiśmie European Journal of Medicinal Chemistry, w 2023 roku. Uwzględnia ona dostępne w literaturze dane na temat pochodnych galusanu epigallokatechiny (EGCG), ze szczególnym uwzględnieniem ich działania biologicznego, a także modyfikacji strukturalnych poprawiających biodostępność oraz aktywność biologiczną. Omawiane badania wykazały, że odpowiednie modyfikacje chemiczne EGCG mogą znacząco zwiększyć jego działanie przeciwnowotworowe oraz przeciwbakteryjne, a także przeciwzapalne i przeciwutleniające. Zaobserwowano synergizm działania pochodnych EGCG z cytostatykami, a także odwrócenie oporności wielolekowej. Modyfikacje strukturalne EGCG pozwalają na otrzymywanie proleków o poprawionych właściwościach fizykochemicznych i farmakologicznych. W połączeniu z częściami wstępnymi do pozostałych publikacji oryginalnych oraz częścią wstępną opisu scalającego, publikacja ta stanowi cenne źródło informacji na temat polifenoli i związanych z nimi szans oraz wyzwań. Zarówno zawartość informacyjna wyżej wskazanych fragmentów rozprawy, jak przejrzysty sposób wypowiedzi świadczą o **wysokiej ogólnej wiedzy teoretycznej Doktoranta w zgłębianej**

dyscyplinie naukowej, wskazując tym samym na całkowite wypełnienie wymagań art. 187 pkt.1 Ustawy.

Publikacja zatytułowana „Gallic Acid-Functionalized, TiO₂-Based Nanomaterial – Preparation, Physicochemical and Biological Properties”, opublikowana w czasopiśmie *Materials*, w 2022 roku, jest pracą oryginalną, przedstawiającą pierwszą część oryginalnych badań własnych Doktoranta, stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień doktora. Praca, poświęcona jest funkcjonalizacji tlenu tytanu (TiO₂) kwasem galusowym i jego wpływowi na właściwości biologiczne i fizykochemiczne uzyskanych nanomateriałów. W badaniach wykazano, że funkcjonalizacja tlenu tytanu kwasem galusowym prowadzi do poprawy właściwości antyoksydacyjnych i może znaleźć zastosowanie w leczeniu trudno gojących się ran. Dokładna analiza fizykochemiczna obejmowała badania spektroskopowe (UV-Vis, FTIR, Raman), mikroskopię elektronową oraz analizy termiczne, które wykazały stabilność i jednorodność strukturalną uzyskanego materiału. Ponadto, testy biologiczne, w tym test DPPH oraz analiza cytotoksyczności na liniach komórkowych fibroblastów, wykazały, że modyfikowane nanocząstki wykazują silne działanie przeciwutleniające i jednocześnie są bezpieczne dla komórek ludzkich.

Trzecia publikacja zatytułowana „Morpholinated curcuminoids against urinary bladder cancer cells: synthesis and anticancer evaluation”, opublikowana w czasopiśmie *Medicinal Chemistry Research*, w 2024 roku, jest pracą oryginalną, która dotyczy syntezy i oceny aktywności przeciwnowotworowej serii nowych pochodnych kurkuminy. Wyniki wykazały, że niektóre modyfikacje strukturalne obejmujące wprowadzenie podstawników morfolinoetoksylowych oraz difluoroboranowych istotnie poprawiają cytotoksyczność wobec komórek raka pęcherza moczowego, przy zachowaniu selektywności wobec komórek zdrowych. Przeprowadzono szczegółowe badania *in vitro*, wykazując, że najaktywniejsze pochodne kurkuminy wykazują IC₅₀ w zakresie nanomolowym, co czyni je znacznie skuteczniejszymi niż wyjściowa kurkumina. Zmodyfikowane pochodne charakteryzowały się również lepszą rozpuszczalnością w wodzie od związku macierzystego.

Ostatnia z cyklu publikacja oryginalna pod tytułem „Quaternized Curcumin Derivative – Synthesis, Physicochemical Characteristics, and Photocytotoxicity, Including Antibacterial Activity after Irradiation with Blue Light”, opublikowana została w czasopiśmie *Molecules* w roku 2024. Skupia się ona na opracowaniu czwartorzędowej amoniowej pochodnej kurkuminy o potencjalnym zastosowaniu w terapii fotodynamicznej, ukierunkowanej przeciw drobnoustrojom.

Badania wykazały wysoką skuteczność związku w eliminacji opornych szczepów bakteryjnych po ekspozycji na światło, co czyni go obiecującym fotosensybilizatorem. Analiza spektralna wykazała, że związek ten wykazuje silną absorpcję w zakresie światła niebieskiego (450–470 nm), co umożliwia skuteczne aktywowanie jego właściwości cytotoksycznych w warunkach naświetlania. Testy mikrobiologiczne wykazały niemal całkowitą eradykację wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych w stężeniach 1-10 μM przy zastosowaniu ekspozycji na światło przez 15-25 minut.

Na szczególne uznanie zasługuje szeroki warsztat metodologiczny, którym posługuje się Doktorant. W świetle zgodnie przedstawionych przez Doktoranta i jego współautorów oświadczeń, obejmuje on zarówno syntezę chemiczną, jak i szeroki wachlarz analiz fizykochemicznych oraz wybrane badania biologiczne. Doktorant wykazał się przy tym umiejętnością współpracy, także międzynarodowej, co z pewnością wpłynęło na rozwój jego kompetencji.

Należy podkreślić, że cele badań eksperymentalnych zostały prawidłowo zdefiniowane, biorąc pod uwagę stan techniki. W świetle przytoczonej argumentacji, opisane badania mają zarówno potencjał poznawczy, jak i aplikacyjny.

Wyniki prac eksperymentalnych są bardzo interesujące. Do szczególnych osiągnięć Doktoranta w tym zakresie należy zaliczyć:

- Opracowanie nowatorskich metod syntezy i funkcjonalizacji polifenoli,
- Optymalizację właściwości fizykochemicznych badanych związków,
- Potwierdzenie skuteczności terapeutycznej badanych związków w warunkach *in vitro*, w kierunku przeciwnowotworowym i przeciwdrobnoustrojowym
- Omówienie właściwości opisanych w literaturze nowych pochodnych EGCG w szerokim kontekście terapeutycznym,
- Opracowanie nowych potencjalnych strategii terapeutycznych opartych na polifenolach,
- Interdyscyplinarne podejście do badań, łączące chemię organiczną, fizykochemiczną i biologię,
- Publikację wyników w renomowanych czasopismach o wysokim współczynniku impact factor,

Warto dodać, że przedstawione wyniki zaopatrzone są szerokimi materiałami dodatkowymi (supporting information), które podkreślają rzetelność wykonanych badań i zwiększają możliwość ich reprodukcji.

Reasumując, należy stwierdzić, że w ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej **dokonano sformułowania i oryginalnego rozwiązania problemu naukowego, wypełniając tym samym wymagania art. 187 pkt. 2.**

Poziom naukowy rozprawy oceniam bardzo wysoko i nie zgłaszam żadnych uwag krytycznych. Analiza ciekawych i wartościowych wyników przedstawionych w treści rozprawy skłoniła mnie do sformułowania kilku pytań, które chciałbym aby stały się przyczynkiem do dyskusji w trakcie obrony:

1. Kurkumina jest definiowana jako tzw. PAINS (*Pan-Assay INterference compoundS*) oraz IMPS (*Invalid Metabolic PanaceaS*). Czy i ewentualnie jaki sposób zastosowane modyfikacje mogły wpłynąć na zaadresowanie tych problemów? Czy w związku z możliwą interferencją kurkuminy i jej pochodnych z oznaczeniami bioluminescencyjnymi można wykluczyć ewentualny wpływ na wyniki testu Microtox?
2. Czy były wykonywane lub są planowane badania stabilności chemicznej otrzymanych związków aktywnych w wodzie o różnym pH, ew. w osoczu? Ciekawym byłoby określenie wpływu zastosowanych modyfikacji na te właściwości, w kontekście ewentualnych dalszych badań biologicznych.
3. Jaka jest przewidywana droga podania związków badanych w publikacji 3? Czy w tym kontekście prowadzone były jakieś rozważania na temat możliwej farmakokinetyki badanych związków aktywnych? Czy doktorant widzi tu jakieś wyzwania?
4. W szczególności ciekawi mnie zgłębianą w publikacji 4 koncepcja zastosowania przeciwbakteryjnego związków wzbudzanych światłem. Jakiego typu zakażenia mogłyby być leczone w ten sposób – powierzchniowe/wewnętrzne? Jak aplikowany byłby związek – powierzchniowo/miejscowo/układowo? Jak aplikowane byłoby światło?
5. Czy aktywność biologiczna badanych związków, wzbudzana światłem, może być problemem w kontekście bezpieczeństwa ich stosowania? Chodzi mi o ew. działanie fotouczulające światła słonecznego względem komórek zdrowych.

Warto dodać, że poza wysokim poziomem naukowym, praca jest również bez zarzutu od strony edytorskiej. Napisana jest zwięzłym i klarownym językiem, a także opatrzona wyjaśnieniami skrótów i odpowiednimi podsumowaniami.

Reasumując, oceniana rozprawa doktorska stanowi oryginalny i indywidualny wkład Doktoranta w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych i spełnia wszystkie wymagania zawarte w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (z późn. zm.). Mając powyższe na uwadze, z pełnym przekonaniem składam wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Pawła Bakuna i dopuszczenie go do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową przedłożonej dysertacji, szeroki warsztat metodologiczny, charakter zarówno poznawczy jak i aplikacyjny, a wreszcie opublikowanie całości materiału w czterech dobrej jakości publikacjach, składam także wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM
Zakład Chemii Leków

prof. dr hab. Marcin Kondezkowski
kierownik