



Olsztyn, 04 kwietnia 2020 r.

dr hab. Mariusz Szabelski, prof. UWM  
Katedra Fizyki i Biofizyki  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski  
ul. Michała Oczapowskiego 4  
10-719 Olsztyn

**Recenzja rozprawy doktorskiej  
Pana mgr Kamila Janusza Durki  
zatytułowanej:**

**„Cytotoksyczność liposomalnych taksanów funkcjonalizowanych peptydem gH625  
wobec ludzkich komórek śródbłonna mikrowaskularnego”**

wykonanej pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Anety Kocevy-Chyła (promotora) i Pani dr Karoliny Matczak (promotora pomocniczego) w Katedrze Biofizyki Medycznej Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi.

Choroby nowotworowe są poważnym problemem społecznym i jedną z głównych przyczyn śmierci na całym świecie. Metody leczenia nowotworów różnią się w zależności od rodzaju nowotworu i zazwyczaj obejmują jedno lub wiele podejść, takich jak chirurgia, radioterapia i chemioterapia. Chemioterapia jest jedną z najbardziej skutecznych metod zwalczania komórek nowotworowych. Niestety leki stosowane w chemioterapii nie są selektywne i niszczą również zdrowe komórki. Skutki uboczne chemioterapii mogą być łagodne lub ciężkie i zależą od rodzaju podawanych leków oraz indywidualnej odpowiedzi pacjenta. Najczęstszymi niepożądanymi skutkami chemioterapii zgłaszanymi przez pacjentów onkologicznych są zmęczenie, nudności, przekrwienie, biegunka i wypadanie włosów.

Na całym świecie w najlepszych laboratoriach naukowych prowadzone są prace nad nowymi syntetycznymi lekami oraz związkami pochodzenia naturalnego wykazującymi potencjalne właściwości antynowotworowe. Istotnym elementem badań jest znalezienie metody dostarczania leku do komórki nowotworowej, ograniczenie jego niepożądanego wpływu na zdrowe komórki organizmu człowieka w trakcie terapii przeciwnowotworowej oraz zjawiska lekooporności. W nurt tych badań doskonale wpisuje się rozprawa doktorska Pana mgr. Kamila Durki. Doktorant w swojej pracy zbadał wpływ dwóch silnie

cytotoksycznych leków przeciwnowotworowych z grupy taksanów oraz ich liposomalnych form na komórki ludzkie śródbłónka mikrowaskularnego HMEC-1. Dodatkowo ocenił cytotoksyczność samego nanonośnika liposomalnego jak również nośnika skoniugowanego z penetrującym błonę peptydem gH625. Należy podkreślić, że badania prowadzone były przy współpracy z prof. Stefania Galdiero z Department of Pharmacy University of Naples "Federico II" we Włoszech, co potwierdza światową rangę problemu i świadczy o uznaniu dla zespołu naukowego, w którym Pan mgr Kamil Durka pracował i przygotowywał rozprawę doktorską.

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja Pana mgr. Kamila Durki liczy sobie 140 stron. Układ recenzowanej rozprawy doktorskiej jest typowy dla tego rodzaju prac. Tekst został podzielony na aż dziesięć rozdziałów: 1. Wstęp (str. 9-31), 2. Założenia i cel pracy (str. 32-34), 3. Materiały (str. 35-38), 4. Metody (str. 39-55), 5. Wyniki (str. 56-107), 6. Dyskusja (str. 108-119), 7. Wnioski (str. 120), 8. Streszczenie (str. 121), 9. Summary (str. 122) i 10. Bibliografia (str. 123-140). W rozprawie znajdziemy 29 rysunków (rycin) i 17 tabel. Cytowana literatura licząca 230 pozycji jest dobrana właściwie i obejmuje najnowsze doniesienia naukowe. Praca napisana jest w sposób czytelny i zrozumiały z małym wyjątkiem, który omówię w dalszej części recenzji. Jest opatrzona licznymi, w większości dobrze zaprojektowanymi rysunkami i tabelami, co w dużej mierze ułatwia zrozumienie materiału. Dodatkowo po spisie treści znajduje się wykaz skrótów, który w znaczący sposób usprawnia czytanie pracy.

Przywilejem recenzenta jest chwalenie autora natomiast obowiązkiem wskazanie błędów, niedociągnięć i wyrażenie uwag krytycznych, które nasunęły się w trakcie czytania, co też czynię poniżej. Pozwolę sobie pominąć wskazanie tak zwanych literówek i usterek stylistycznych. Na wstępie chciałbym się odnieść do stosowanego przez Doktoranta słowa „Rycina”. W mojej opinii należałoby w jego miejsce stosować słowo „Rysunek”, jak to jest przyjęte w nowoczesnych opracowaniach naukowych. Odniosłem też wrażenie, że w niektórych momentach autor stosuje wyrażenia lub słowa należące do tzw. „żargonu” specjalistycznego. Sugeruję w miarę możliwości unikać tego rodzaju słownictwa, ponieważ może być ono niezrozumiałe czy mylące dla osób czytających pracę a niebędących specjalistami w danej dziedzinie.

**Wstęp** zawiera przegląd literatury tematu. Doktorant opisał metody otrzymywania, budowę chemiczną i działanie taksanów oraz peptydy penetrujące błony komórkowe. Autor nie ustrzegł się kilku drobnych literówek i lapsusów słownych jak np. „*minimalna sekwencja*” zamiast „*najkrótsza sekwencja*”, ale również błędów i braków merytorycznych, które

zwróciły moją uwagę i wymagają komentarza. Strona 13, piąty wiersz od dołu, opisując budowę chemiczną taksanów autor napisał: „*Trójcykliczny pierścień taksanowy zawiera dwa pierścienie 6-członowe i jeden 8-członowy oraz pierścień oksetanowy, przyłączony w pozycji C-4 i C-5 (Zejc i wsp., 2009; Surapaneni i wsp., 2012) (Rycina 1.1)*”. Doktorant wymienia cztery pierścienie, dlaczego więc używa nazwy „*trójcykliczny pierścień taksanowy*”? Różni autorzy w swoich pracach w różnoraki sposób opisują *pierścień taksanowy*, należy wybrać jeden z nich a nie łączyć opisy z różnych publikacji. Na stronie 17, dziesiąty wiersz od góry oraz powtórzenie na stronie 19, dziewiąty wiersz od dołu: „*Paklitaksel wiąże się na końcu N aminokwasu znajdującego się w pozycji 31 podjednostki  $\beta$ -tubuliny (Rycina 1.2)*.” takie sformułowanie jest niepoprawne. Termin „N koniec” w chemii peptydów i białek jest jednoznacznie zdefiniowany i oznacza początek sekwencji głównego łańcucha peptydowego. Autorowi zapewne chodziło o atom azotu znajdujący się na końcu łańcucha bocznego aminokwasu znajdującego się w pozycji 31. Czy jednak jest to prawdą i paklitaksel wiąże się z jednym aminokwasem wskazanym przez autora? Niestety nie, wystarczy zajrzeć do pracy Tabaczar S., Koceva-Chyła A., Matczak K., Gwoździński K. Molekularne mechanizmy aktywności przeciwnowotworowej taksanów. I. Oddziaływanie docetakselu na mikrotubule. Postepy Hig Med Dosw (2010) 64: 568-581, którą doktorant podał w spisie literatury, aby się przekonać, że jest to dużo bardziej złożony proces i niestety nie znalazłem tam wzmianki o 31 aminokwasie. Należałoby w pracy umieścić właściwy i bardziej rozbudowany opis wiązania się dwóch omawianych taksanów do  $\beta$ -tubuliny nie zapominając, że leki z tej grupy po przyłączeniu się do  $\beta$ -tubuliny przyjmują formę litery T zwaną również „formą motyla”.

W kolejnej części Pan mgr. Kamil Durka prezentuje **Założenia i cel pracy**. Doktorant przedstawił uzasadnienie podjęcia tematu badań oraz czym się kierował w doborze obiektów do badań. Jasno sformułował cel pracy oraz hipotezy badawcze. Należy podkreślić, że wybrane nanoformy taksanów nie były do tej pory badane i umieszczone w dysertacji wyniki są pierwszymi uzyskanymi dla tych obiektów, co niewątpliwie stanowi jakże ważny element nowości i wyjątkowości tej pracy. Jako recenzent nie mam krytycznych uwag do tej części.

Na kolejnych stronach znajduje się omówienie **Materiałów** stosowanych do badań a w dalszej części doktorant opisał **Metody**, które stosował w trakcie realizacji projektu. W mojej opinii ta część jest niedopracowana i zawiera sporo istotnych błędów. W rozdziale Metody autor podaje wzory strukturalne oraz reakcje jakim ulegają zastosowane chromofory i fluorofory natomiast całkowicie pomija ich widma absorpcji i fluorescencji a jedynie w tekście podaje długości fal wzbudzenia i obserwacji. Prezentacja widm ułatwiłaby zrozumienie wyboru długości fal (ustawień aparatury naukowej) w wykonywanych

doświadczeniach. Brak jest również podrozdziału, w którym byłyby zaprezentowane wszystkie równania matematyczne wraz z uzasadnieniem ich wyboru, stosowane do dopasowania krzywych i obliczania poszczególnych parametrów. Opisy użytych odczynników i stosowanych procedur powinny być jasne oraz nie budzić wątpliwości, umożliwiając tym samym ich odtworzenie w dowolnym laboratorium. Niestety tak nie jest np. na stronie 40, w opisie wykonania oznaczenia jest napisane: „Z zawiesiny komórek, uzyskanej w wyniku trypsynizacji monowarstwy, pobierano 3 próby o objętości 100  $\mu\text{l}$  każda i barwiono 4% roztworem błękitu trypanu w NaCl w stosunku objętości 1:1.” Należało podać jakie było stężenie NaCl i do czego odnosi się sformułowanie w stosunku objętości 1:1, przy takim zapisie można się jedynie domyślać. W Tabeli 4.1. umieszczonej na stronie 42, oznaczenia poszczególnych związków (II kolumna) są całkowicie niezrozumiałe i inne niż w dalszym tekście (dotyczy pozycji: *Nanonośnik liposomalny (Lipo)*, *Nanonośnik liposomalny skoniugowany z penetrującym peptydem gH625*, *Peptyd penetrujący gH625*). Dlaczego w pozycji *Nanonośnik liposomalny skoniugowany z penetrującym peptydem gH625* są aż cztery wartości stężeń, a dla dwóch użyto tego samego symbolu *gH625min*? W dodatku wygląda jakby to był błąd i brakowało właściwych dwóch stężeń maks. i min., ponieważ jest to powtórzenie wartości z dwóch pozycji powyżej i dwóch z poniżej. W kolejnej Tabeli 4.2. również jest błąd: *PTX enkapsulowany w nanonośniku liposomalnym skoniugowanym z peptydem gH625 (LipoDTX-gH625)* a powinno być *LipoPTX-gH625*. Co gorsza Doktorant popełnia błędy nawet w tytułach podrozdziałów. Podrozdział 4.5.2. został zatytułowany „*Mikroplótkowy test spektrofotometryczny z resazuryną (REMA)*” sugerując wykonanie pomiarów absorbancji, natomiast w opisie wykonania oznaczenia Doktorant mierzył sygnał fluorescencji, więc w tytule powinno być *test spektrofluorymetryczny*. W następnym podrozdziale 4.5.3. „*Mikroplótkowy test spektrofluorymetryczny z sulforodaminą B (SRB)*” sytuacja jest odwrotna. Tytuł sugeruje pomiar fluorymetryczny natomiast opisane są pomiary absorbancji. W tym miejscu nasuwa się kolejne pytanie, skoro do badań zastosowano znany znacznik fluorescencyjny sulforodaminę B to, dlaczego mierzono absorbancję zamiast sygnału fluorescencji, przecież Doktorant dysponował odpowiednim sprzętem? Ogólnie wiadomo, że pomiary sygnału fluorescencji (najniższe mierzalne stężenia  $\sim 10^{-10}$  mol/dm<sup>3</sup>) są dużo bardziej czulsze niż pomiary absorbancji (najniższe mierzalne stężenia  $\sim 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>). Niepewność pomiaru byłaby wtedy dużo mniejsza. W tym samym podrozdziale na rysunku przedstawiającym strukturę chemiczną soli sodowej sulforodaminy B jest błąd. Jak sam autor podpisał jest to sól, więc skąd na rysunku pomiędzy tlenem a sodem jest narysowane wiązanie kowalencyjne (-O-Na)? Jest to sól kwasu sulfonowego, czyli mamy do czynienia z

wiązaniem jonowym i na schemacie powinno być  $\text{-O}^-\text{Na}^+$  lub  $\text{-ONa}$ . Strona 49, wiersz 2 od góry autor napisał: „*W celu wykrycia dwuniciowych pęknięć DNA przeprowadza się elektroforezę w warunkach neutralnych.*”. Chciałbym zapytać co autor miał na myśli używając zwrotu *warunki neutralne*? Czy chodzi tu o wartość pH np. pH fizjologiczne, pH obojętne? Strona 49, wiersz 12 od góry „*Po tym czasie do odpowiednich szalek dodawano wolne i litaksany, liposomalną formę taksanów oraz liposomalną formę taksanów zawierająca ligand peptydowy gH625.*” wydaje się, że to zdanie powinno brzmieć „*Po tym czasie do odpowiednich szalek dodawano wolne **taksany**, liposomalną formę taksanów oraz ...*”. Ta sama strona wiersz 8 od dołu „*Szkiełka lizowano w zimnym buforze...*” chciałem zwrócić uwagę, że z pewnością autor nie lizował szkiełek a komórki na nich osadzone. Strona 50, piąty wiersz od góry „*Glutation zbudowany jest z trzech aminokwasów (L-glutamina, cysteina, glicyna) ...*”, niestety nie mogę się z tym zgodzić, nie rozumiem też czemu autor określił izomerię optyczną tylko pierwszego aminokwasu a nie podał tej informacji w przypadku cysteiny. W sekwencji glutationu pierwszym aminokwasem jest kwas L-glutaminowy a nie glutamina jak to napisał Doktorant. Dodatkowo należałoby uzupełnić, że również cysteina jest L enancjomerem oraz zamiast standardowego wiązania peptydowego między grupą aminową ( $\text{-NH}_2$ ) cysteiny i grupą  $\alpha$ -karboksylową ( $\text{-COOH}$ ) kwasu glutaminowego, tworzy się wiązanie z grupą  $\gamma$ -karboksylową tego aminokwasu. Strona 51, wiersz 11 od dołu „*Roztwór podstawowy MCB o stężeniu 40 mmol przygotowano rozpuszczając...*” autor źle zapisał stężenie. 40 mmol jest licznoscia materii a nie stężeniem, poprawnie należy zapisać w postaci 40 mM lub  $40 \text{ mmol/dm}^3$ . W następnym zdaniu autor podaje warunki pomiaru fluorescencji (strona 51, wiersz 10). Przejrzystość procedury wymaga przeniesienia tego zdania. Warunkiem poprawnego wykonania pomiaru sygnału fluorescencji od koniugatu biman-glutation (GSH-MCB) jest wcześniejsze odmycie barwnika, który nie wniknął do komórek. Ta uwaga dotyczy również pozostałych opisów metod opisywanych przez Doktoranta. Zawsze przed wykonaniem pomiaru absorbancji czy też sygnału fluorescencji należy odmyć nadmiar barwnika, który nie wniknął do komórki inaczej otrzymane wyniki będą zafałszowane. Strona 55, pierwszy wiersz „*...(Po tym) czasie usuwano sondę i lizowano komórki dodając 50  $\mu\text{l}$  buforu lizującego...*”, to zdanie powinno brzmieć „*...(Po tym) czasie usuwano nadmiar sondy fluorescencyjnej i lizowano komórki dodając 50  $\mu\text{l}$  buforu lizującego...*”.

Na dalszych stronach dysertacji znajduje się prezentacja wyników (rozdział **Wyniki**) uzyskanych przez Pana mgr. Kamila Durkę w trakcie realizacji doktoratu a dalej niezbyt długa ich **Dyskusja**. Muszę przyznać, że nie podoba mi się takie rozwiązanie. W mojej opinii

te dwa rozdziały powinny stanowić jedną całość i posiadać tytuł np. Prezentacja i Dyskusja Wyników. Opis niektórych wyników jest zbyt lakoniczny i w rezultacie niejasny. Dołożenie dyskusji poprzez połączenie dwóch rozdziałów, ułatwiłoby zapoznanie się z tymi wynikami i w znaczący sposób podniosłoby jakość dysertacji, tym bardziej że w rozdziale Dyskusja jest wiele powtórzeń stwierdzeń z wcześniejszych stron i czasami bardziej przypomina on wstęp teoretyczny niż dyskusję wyników. W pierwszym podrozdziale Doktorant prezentuje bardzo ciekawe zdjęcia mające przedstawiać morfologię badanych liposomów wykonane przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) natomiast brakuje jakiegokolwiek dyskusji. Bardzo bym prosił Pana mgr. Durkę o dokładne omówienie tych zdjęć w trakcie obrony. Na podstawie małych zdjęć umieszczonych w dysertacji trudno wyciągnąć jakieś wnioski. Na przykład porównując zdjęcia (ta sama skala) a) pusty liposom i d) liposom skoniugowany z peptydem gH625 oraz b) liposom z enkapsulowanym paklitakselem i e) liposom skoniugowany peptydem gH625 z enkapsulowanym paklitakselem na zdjęciach liposomów skoniugowanych z peptydem gH625 nie widać struktury liposomów, dlaczego? Część wykresów jest całkowicie nieczytelna ze względu na sposób prezentacji danych są to Ryciny 5.2.-5.4.; 5.13.-5.17. Jaki jest sens łączenia punktów odcinkami prostymi, które ma miejsce, gdy nie jest dopasowywana krzywa? O braku prezentacji równań używanych przez autora do dopasowania krzywych już wspominałem powyżej. Często podobne zmiany na wykresach określane są jako nieistotne a w innym przypadku uznawane za istotne - jakimi kryteriami kierował się Doktorant? Jaka była ilość powtórzeń dla jednych określonych warunków np. dla danego stężenia? Ile razy powtarzane były doświadczenia? Takich informacji nie znalazłem w przedstawionej do recenzji pracy, a przecież autor wylicza średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe. Strona 88, trzeci akapit w zdaniu „Zagregowana forma JC-1 wykazuje czerwono-pomarańczową fluorescencję (485/538 nm), a forma monomeryczna – zieloną (530/590 nm).” błędnie zostały podane długości fal, powinno być: „Zagregowana forma JC-1 wykazuje czerwono-pomarańczową fluorescencję (530/590 nm), a forma monomeryczna – zieloną (485/538 nm)”. W rozdziale Wyniki pojawiają się oznaczenia, które powinny być wyjaśnione i wymienione w Tabeli 4.1. (wspomnianej wcześniej): LipoMIN, LipoMAX, gH625min, gH625max, LipoMIN-gH625, LipoMAX-gH625, Lipo-gH625min, Lipo-gH625max. Można się dosyć łatwo domyśleć co oznaczają cztery pierwsze oznaczenia, to już kolejne wymagają dokładnego wyjaśnienia. Z pracy wynika, że syntezę i charakterystykę nanonośników wykonano przez zespół prof. Stefanii Galdiero (Department of Pharmacy and DFM Scarl, University of Naples “Federico II”, Naples, Italy) a co z liposomami z enkapsulowanymi lekami (modyfikowane peptydem gH625 i niemodyfikowane)? Czy

Doktorant przygotowywał je samodzielnie? Jaka była procedura? Brakuje też informacji jakie było stężenie leków w liposomach i jak to się ma do stężeń leków w postaci niezwiązanej stosowanych w badaniach?

Dysertacja Pana mgr. Kamila Durki kończy się wnioskami wymienionymi w punktach oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Należy podkreślić, że Doktorant w swojej pracy wykazał słuszność postawionej hipotezy badawczej. Udowodnił, że możliwe jest obniżenie toksyczności dwóch leków przeciwnowotworowych paklitakselu i docetakselu poprzez ich enkapsulację w pegylowanym liposomie skoniugowanym z peptydem gH625 wobec mikrowaskularnych komórek linii HMEC-1. Dzięki takiemu zabiegowi pojawienie efektów cytotoksycznych jest opóźnione w czasie a ich natężenie znacząco obniżone. Dodatkowo wykazał, że sam nanonośnik liposomalny ani jego funkcjonalizacja peptydem gH625 nie wywołuje negatywnych skutków wobec badanych komórek. W mojej ocenie zaprezentowane badania i ich wyniki są niesłychanie ważne dla rozwoju leków antynowotworowych i chemioterapii, pokazują bowiem jak można w znaczący sposób zmniejszyć ich cytotoksyczność i zwiększyć biodostępność. Dodatkowo zaprezentowana metoda enkapsulacji leku w pegylowanym liposomie skoniugowanym z peptydem gH625 może być zastosowana do wprowadzania do organizmu człowieka innych substancji leczniczych trudno rozpuszczalnych w wodzie. Co najważniejsze są to oryginalne badania naukowe i wykonane po raz pierwszy na świecie. Pomimo wskazanych przeze mnie błędów i niedociągnięć uważam przedstawioną do recenzji dysertację za bardzo wartościową pod względem naukowym i wpisującą się w jeden z najważniejszych nurtów badań w walce z chorobami nowotworowymi. Liczę, że w niedługim czasie zaprezentowane wyniki zostaną opublikowane w renomowanym czasopiśmie.

Podsumowując, stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska Pana mgr. Kamila Durki, przygotowana pod opieką Pani prof. dr hab. Anety Kocevy-Chyła i Pani dr Karoliny Matczak, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jak również wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta i dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Autor rozprawy spełnia wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora. Wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr. Kamila Durki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Marcin Szabelski