



Prof. dr hab. Zofia Lipkowska

01-224 Warszawa  
ul. Kasprzaka 44/52  
Tel. (22) 343 22 07  
Fax.: (22) 632 66 81  
E-mail: zofia.lipkowska@icho.edu.pl

Warszawa, 06.02.2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Gorzkiewicza  
p.t.**

**Dendrymery polipropylenoiminowe jako nośniki przeciwnowotworowych  
nukleotydów adenozytowych**

Polepszenie terapii nowotworów poprzez pozyskiwanie nowych związków aktywnych jak i opracowywanie nowych strategii ich dostarczania do komórek to aktualny temat badań w chemii medycznej i farmakologii. W szczególności, prace nad poprawą własności farmakodynamicznych związków szeroko stosowanych w medycynie o już znanym mechanizmie działania, metabolizmie a także skutkach ubocznych są zasadne zarówno ze względów medycznych jak i ekonomicznych. Jednym z intensywnie rozwijanych wątków jest badanie systemów dostarczania leków opartych na nanotechnologii.

Prof. Barbara Klajnert – Maculewicz, promotorka obecnej pracy, realizuje ten bardzo aktualny kierunek badawczy biorąc na cel terapię białaczek. Analogi nukleozydów od lat szeroko stosowane w terapii tego typu nowotworów mają kilka istotnych negatywnych efektów, które uwidaczniają się szczególnie podczas ich długotrwałego podawania. Jednym z nich jest lekooporność, powstająca albo na skutek obniżenia ekspresji białek transportujących nukleozydy przez błony komórkowe lub obniżenia aktywności kinaz. Wiąże się to ze szlakiem metabolicznym tych leków, polegającym na wprowadzeniu do komórki białaczki wolnego nukleozydu lub monofosforanu a następnie stopniową jego fosforylację przez wewnątrzkomórkowe kinazy do powstania formy aktywnej, tzn. trifosforanu. Strategia zaproponowana i rozwijana przez Panią Promotorkę polega na zastosowaniu nanocząsteczkowych nośników z grupy dendrymerów - rozgałęzionych polimerów o regularnej budowie i wysokiej monodispersyjności. Prace prowadzone na Świecie ale także w ośrodku Łódzkim udowodniły, że najczęściej badane polikationowe dendrymery co prawda bardzo dobrze wnikają do komórek ale są wysoce toksyczne. Dlatego od kilku lat w grupie Pani Promotor bada

się dendrymery polipropylenoiminowe czwartej generacji (w skrócie PPI) w których ok 30 % grup aminowych zostało sfunkcjonalizowanych maltozą (w skrócie PPI-Mal). Takie działanie ma dwa cele. Po pierwsze, dendrymery pokryte jednostkami cukrowymi mają mniejszy ładunek dodatni a więc i mniejszą toksyczność. Jednocześnie komórki białaczek wykazują na powierzchni nadekspresję wiążących węglowodany receptorów lektynowych, co daje szansę na selektywność wobec komórek nowotworowych. Metodyka ich syntezy i metod charakteryzowania została opracowana w zespole prof. D. Apelhans'a, który współpracuje od lat z grupą prof. Klajnert-Maculewicz.

Powstała na tej kanwie praca doktorska mgr Michała Gorzkiewicza, której promotorką jest prof. dr hab. Barbara Klajnert-Maculewicz to zestaw publikacji, w skład którego wchodzi jedna praca przeglądowa (nr. 1) oraz cztery prace oryginalne (nr. 2 – 5). Mgr Gorzkiewicz w każdej z nich jest pierwszym współautorem a w pracy pierwszej także autorem korespondencyjnym. Analiza danych bibliometrycznych pokazuje, że ich łączny współczynnik wpływu (Impact Factor) wynosi 23.836 a łączna liczba punktów według listy czasopism punktowanych MNiSW wynosi 210, co jest wynikiem bardzo dobrym.

Według oceny Doktoranta jego merytoryczny wkład w opracowaniu publikacji, będących przedmiotem oceny polegał na „... na planowaniu i wykonaniu większości doświadczeń, analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu...” a wkład procentowy wahał się pomiędzy 55 – 70 %. Z załączonych pisemnych oświadczeń 13-stu współautorów tych prac wynika, że ich wkład wahał się pomiędzy 2 -10 %. Tak więc mgr Gorzkiewicz był pomysłodawcą i głównym wykonawcą wszystkich prac eksperymentalnych a także ma wkład w opracowanie wyników i także napisanie manuskryptu. Baza Web of Science zawiera w sumie 20 prac z Jego współautorstwem, które były już cytowane 92 razy.

Dodatkowo załączone zostały takie informacje jak: źródła finansowania badań, współpraca naukowa, spis publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej i ich kopie, omówienie celu naukowego, streszczenie w języku polskim i angielskim, dorobek naukowy oraz oświadczenia współautorów.

### **1. Ocena koncepcji badań, celów badawczych oraz narzędzi wybranych do ich realizacji**

Celem badań będących przedmiotem pracy doktorskiej mgr Michała Gorzkiewicza było potwierdzenie tezy, że niekowalencyjne kompleksy tworzone przez dendrymer PPI sfunkcjonalizowany na powierzchni w ok. 30% maltozą z szeroko stosowanym w terapii białaczek (w tym formy ostrej), fluorowanym analogiem adenozyiny o nazwie fludarabina, jej mono- i trifosforanem są trwałe, mogą być transportowane efektywnie do komórek i wykazują efekt terapeutyczny.

Tematyka pracy jest aktualna, cele ambitne a zakres badań i metody użyte do osiągnięcia celu zostały głęboko przemyślane, dobrze zaprojektowane i przyniosły bardzo wartościowy wynik nie tylko w postaci serii publikacji. Poniżej podsumowuję najważniejsze wnioski zawarte w publikacjach przedstawionych do oceny

1. **Gorzkiwicz M., Klajnert-Maculewicz B. (2017), Dendrimers as nanocarriers for nucleoside analogues, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 114:43-56. IF 4.491, MNiSW 40**

Praca ta napisana jest wspólnie z Promotorką stanowi compendium wiedzy na temat zastosowania dendrymerów w charakterze nośników nukleozydów i nukleotydów stosowanych obecnie w medycynie jako leki antywirusowe lub przeciwnowotworowe. Praca zawiera przegląd typów dendrymerów stosowanych w badaniach medycznych i ich kowalencyjnych i niekowalencyjnych połączeń z nukleozydami. Autorzy zdefiniowali główne wyzwania na drodze poszukiwania nowych form nośników służących do polepszenia własności farmakodynamicznych stosowanych obecnie leków. Istotnym fragmentem publikacji są liczne wcześniejsze badania pochodzące z grupy Pani Promotor. Przygotowanie tej pracy było zapewne dla mgr Gorzkiwicza dobrym sposobem na identyfikację celów pracy doktorskiej i zapoznanie z metodyką badań.

2. **Gorzkiwicz M., Buczkowski A., Appelhans D., Voit B., Pułaski Ł., Pałecz B., Klajnert-Maculewicz B. (2018), Poly(propyleneimine) glycodendrimers non-covalently bind ATP in a pH- and salt-dependent manner – model studies for adenosine analogue drug delivery, International Journal of Pharmaceutics, 544(1):83-90. IF 3.862, MNiSW 40**

Celem jaki postawiono i rozwiązano w tej pracy było udowodnienie powstawania trwałego kompleksu pomiędzy formą aktywną, tzn trifosforanem fludarabiny a modyfikowanym maltozą dendrymerem PPI, wyznaczenie jego stechiometrii i stałej kompleksowania. Następnie zbadano aktywność cytotoksyczną kompleksów nośnika z mono- i trifosforanem fludarabiny wobec trzech linii komórkowych białaczki. Stosując odpowiedni inhibitor udowodniono niezależną od związanego z błonowym nukleotransferazą hENT1 drogę transportu kompleksów do komórek białaczki. Na podstawie testów z zastosowaniem barwników fluorescencyjnych udowodniono, że mechanizm aktywności cytotoksycznej jest taki sam jak dla obecnie stosowanej w leczeniu formy fludarabiny i polegają na zahamowaniu procesu biosyntezy DNA/RNA, uaktywnieniu Caspase-3, która jest wyznacznikiem zapoczątkowania procesu apoptozy oraz eksternalizacji fosfatydyloseryny, której pojawienie się potwierdza zachodzenie procesu apoptozy. Podsumowując scharakteryzowano powstanie, i właściwości kompleksu trifosforanu fludarabiny z dendrymerem PPI-Mal, zmierzono jego cytotoksyczność wobec trzech linii białaczki, potwierdzono niezależną od endogennego metodę transfekcji i niezależny od nośnika mechanizm działania.

3. **Gorzkiwicz M.**, Jaczak-Pawlik I., Studzian M., Pułaski Ł., Appelhans D., Voit B., Klajnert-Maculewicz B. (2018), Glycodendrimer nanocarriers for direct delivery of fludarabine triphosphate to leukemic cells: improved pharmacokinetics and pharmacodynamics of fludarabine, *Biomacromolecules*, 19(2):531-543. **IF 5.738, MNiSW 45**

W pracy tej potwierdzono niezależną drogę wnikania kompleksów aktywnych form fludarabiny: mono- i trifosforanu z PPI-Mal do trzech typów komórek białaczki. Stwierdzono, że posiadają one podobną aktywność tylko gdy znajdują się już komórce. Jednakże czynnikiem warunkującym aktywność trifosforanu fludarabiny jest obecność dendrymerowego nośnika. Różnią się także mechanizmem oddziaływania z RNA. Doktorant wykazał, że klofarabina analog fludarabiny podstawiony chlorem w miejsce fluoru jest silniejszym inhibitorem biosyntezy DNA/RNA niż fludarabina to zastosowanie kombinacji fludarabiny skompleksowanej z dendrymerowym nośnikiem pozwoliłoby na jej praktyczne zastosowanie.

4. **Gorzkiwicz M.**, Deriu M.A., Studzian M., Janaszewska A., Grasso G., Pułaski Ł., Appelhans D., Danani A., Klajnert-Maculewicz B. (2019), Fludarabine-specific molecular interactions with maltose-modified poly(propyleneimine) dendrimer enable effective cell entry of the active drug form: comparison with clofarabine, *Biomacromolecules*, 20(3):1429-1442. **IF 5.667, MNiSW 45**

Badanie mechanizmu internalizacji oraz cytotoksyczności na poziomie komórkowym różnych form fludarabiny w porównaniu do analogu posiadającego w cząsteczce atom chloru – cytarabiny to cel osiągnięty w pracy nr 4. Nowym elementem jest opracowanie syntezy znaczonej trytem pochodnej trifosforanu fludarabiny z trytylowanego nukleozydu za pomocą procedury „one pot” i sekwencyjnego wykorzystania odpowiednich kinaz. Co więcej, ta seria enzymatycznych reakcji wykazuje prawie ilościową wydajność i jest nową drogą otrzymywania podobnych pochodnych. Wykorzystując te pochodne stwierdzono, że proces internalizacji jest szybki i niezaburzony przez obecność PPI-Mal. Zastosowano także metodę Surface Plasmon Resonance (SPR) do niezależnego potwierdzenia i scharakteryzowania różnic w procesie kompleksowania fludarabiny i cytarabiny w postaci wolnej i trifosforanu z PPI i PPI-Mal. W pracy zastosowano obliczenia dynamiki molekularnej do znalezienia różnic w budowie i termodynamice tworzenia odpowiednich kompleksów. Podstawową konkluzją wynikającą z tych badań jest stwierdzenie, że etapem kluczowym na ścieżce metabolicznej jest fosforylowanie fludarabiny przez kinazy do formy trifosforanu. Umożliwienie dostarczenia aktywnej formy w sposób niezależny od komórkowego systemu transportu nukleozydów i w odpowiednim stężeniu jest kluczem do jej wysokiej cytotoksyczności.

5. **Gorzkiwicz M.**, Appelhans D., Boye S., Lederer A., Voit B., Klajnert-Maculewicz B. (2019), Effect of the structure of therapeutic adenosine analogues on stability and surface electrostatic potential of their complexes with

poly(propyleneimine) dendrimers, *Macromolecular Rapid Communications*, 40(15):1900181. IF 4.078, MNiSW 40

Ocena powstawania, stechiometrii i stabilności kompleksów trójfosforanów fludarabiny i klofarabiny z dendrymerami PPI i PPI-Mal, scharakteryzowana od strony zjawisk powierzchniowych na granicy dendrymer/ligand to przedmiot pracy nr 5. Eksperymentalna baza to pomiary potencjału zeta w różnych warunkach środowiskowych a także zastosowanie dwóch technik chromatograficznych – ultrafiltracji, i frakcjonowanie przepływowo w asymetrycznym polu sił przepływu (ang. *asymmetric flow field-flow fractionation*, AF4). Obydwie metody separacyjne pozwalają na śledzenie powstających agregatów molekularnych, i określenie ich stechiometrii. Badania te przeprowadzono w różnym pH i dla roztworów o różnej sile jonowej. Daje to przybliżenie warunków jakie kompleks nośnik/lek napotyka w komórce – warunki obniżonego pH są charakterystyczne dla komórek nowotworowych a tzw. „high salt conditions” zmieniają dostępność nie tylko błonowych receptorów ale także potencjał na powierzchni kompleksu. Najważniejsze wnioski wynikające z tej pracy to eksperymentalne potwierdzenie wyników z obliczeń dynamiki molekularnej, wskazujących że różnice w cytotoksyczności między trifosforanami fludarabiny i klofarabiny (chlorowy analog fludarabiny) polega na różnicy w ich oddziaływaniach elektrostatycznych z powierzchnią dendrymerów PPI i PPI-Mal. Wydaje się, że te eksperymenty dodatkowo potwierdzają fakt że chociaż teoretycznie możliwa jest inkluzja cząsteczek leku do wnętrza dendrymeru to jednak większość zjawisk determinujących jego powstawanie i późniejsze zachowanie właściwości to jednak procesy zachodzące na powierzchni dendrymeru.

Wyniki oznaczeń SPR i modelowania komputerowego wykonanych dla kompleksów dendrymer/lek (praca 4) zostały uzupełnione przez analizę fluktuacji powierzchniowego potencjału elektrostatycznego z wykorzystaniem pomiarów potencjału zeta. Zastosowanie dwóch technik separacyjnych: ultrafiltracji i frakcjonowania przepływowego w asymetrycznym polu sił przepływu (AF4) pozwoliło natomiast na scharakteryzowanie stabilności kompleksów w różnych warunkach pH i siły jonowej.

Wymienione wyżej publikacje są wieloautorskie i poza pierwszą, powstały w ramach współpracy krajowej i międzynarodowej. Finansowane były głównie z grantu NCN Promotorki typu OPUS i częściowo z programu COST Action CA17140, którego jest Ona inicjatorką i osobą kierującą. Przewodnik po publikacjach zawiera oświadczenia współautorów tych prac o dominującej roli doktoranta w ich planowaniu, fizycznej realizacji oraz opracowaniu w formie publikacji. Zastanawia jednak w oświadczeniach współautorów brak autora glikozylowanej (maltoza) pochodnej PPI. Jeżeli nawet na potrzeby projektu wykonana była jedynie resynteza i charakterystyka spektroskopowa to czas i doświadczenie potrzebne do uzyskania związku o spektroskopowej czystości wymaga dużego doświadczenia i jest co najmniej tak czasochłonne jak wykonanie kilku testów z jego udziałem (które w końcu też wykonuje się według przepisu

podanego przez producenta). Dodatkowo w każdej z wymienionych prac brakuje charakterystyki polidispersyjności użytego koniugatu PPI z maltozą (np. metodą DLS). Skoniugowanie powierzchni dendrymeru PPI zawierającego 64 grupy aminowe z resztą maltozy jest statystyczne (30 %) i prowadzi do materiału, w którym cząsteczki mogą się różnić nie tylko wielkością ale też innym rozłożeniem reszt cukrowych na powierzchni. Co więcej, związki otrzymane w różnych sekwencjach niezależnych reakcji też mogą się różnić polidispersyjnością. Powstaje pytanie czy wszystkie badania biochemiczne i biofizyczne przeprowadzono na materiale otrzymanym w jednej syntezie i czy np. różnice w stechiometrii tworzonych kompleksów nie wynikają w części z polidispersyjności próbek.

Poza tą drobną uwagą bardzo wysoko oceniam poziom merytoryczny i bogactwo wykonanych eksperymentów, dużą dociekliwość Doktoranta, która pozwala Mu na spojrzenie na to samo zjawisko z różnych stron a także łączenie eksperymentu z metodami obliczeniowymi. W wyniku prowadzonych prac powstała dogłębna i wszechstronna charakterystyka zachowania dendrymerów PPI w charakterze nośników nukleotydów i nukleozydów wobec takich zmiennych jak siła jonowa, pH i chemiczna struktura kompleksowanych cząsteczek. Prace 4 i 5 są dowodem na istotne zrozumienie specyfiki zastosowanych metod, które mogą faworyzować inne warunki kinetyczne lub termodynamiczne i wpływać na wyniki pomiaru.

W zasadzie, wszystkie prace przeszły pomyślnie przez „sito” recenzowania podczas ich publikowania a ich wysoka wartość naukowa i pogładowa jest dla mnie niewątpliwa.

### **Podsumowanie i wnioski końcowe**

Podsumowując stwierdzam, że Doktorant w pełni potwierdził założenia pracy doktorskiej. Temat pracy został doskonale przemyślany a wielowątkowy i interdyscyplinarny plan badawczy został zrealizowany z ogromną konsekwencją i z dbałością o szczegóły. Jest to cenne i oryginalne osiągnięcie naukowe, które dotyka ważnego problemu lekooporności w terapii nowotworów. Mgr Gorzkiewicz dowiódł, że doskonale opanował wiele technik z zakresu chemii fizycznej i biochemii a ich połączenie ze znakomitą znajomością literatury pozwoliło znacznie poszerzyć wiedzę w zakresie zjawisk rozpoznania i transportu komórkowego nukleozydów i nukleotydów o znaczeniu terapeutycznym.

W moim przekonaniu, rozprawa doktorska Pana mgr Michała Gorzkiewicza p.t. „ **Dendrymery polipropylenoiminowe jako nośniki przeciwnowotworowych nukleotydów adenozytowych**” spełnia wymagania Ustawy o Stopniach i Tytułach Naukowych z dnia 14 marca 2003, z późniejszymi zmianami.

W związku z powyższym wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do Spraw Stopni Naukowych w Dyscyplinie Nauki Biologiczne o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na aktualność podjętej tematyki, interdyscyplinarne podejście, wysoką jakość merytoryczną i fakt opublikowania tych prac w czasopismach o wysokim czynniku oddziaływania wnioskuję o wyróżnienie tej pracy.

Warszawa, 06.02.2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Z. Lipkowski', is written in a cursive style.