



Poznań, 26.08.2022

### RECENZJA

**rozprawy doktorskiej pt. „Nanonośniki różu bengalskiego w terapii fotodynamicznej raka podstawnokomórkowego skóry” wykonanej przez mgr Krzysztofa Sztandere w Katedrze Biofizyki Ogólnej Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem naukowym promotora prof. dr hab. Barbary Klajnert-Maculewicz oraz promotora pomocniczego dr Michała Gorzkiewicza**

Recenzja została przygotowana na podstawie decyzji Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne z dnia 28 czerwca 2022 roku.

Uzyskanie skuteczności terapeutycznej każdego leku, zarówno nisko- jak i wielkocząsteczkowego jest związane z jego dostarczeniem do miejsca docelowego w organizmie przy jednoczesnym ograniczeniu akumulacji leku poza oczekiwanym miejscem jego działania. Istotnym problemem w naukach biomedycznych oraz chemii medycznej jest opracowanie odpowiedniej metody dostarczania leku w sposób ukierunkowany, selektywny w odniesieniu do zdrowych tkanek, przy zapewnieniu kontrolowanej szybkości i lokalizacji uwalniania. Brak odpowiedniego nośnika dla leku, przekłada się na jego profil farmakokinetyczny, może odpowiadać za niską biodostępność, niestabilność i krótki okres półtrwania w osoczu, co powoduje konieczność wielokrotnego podawania wysokich dawek dla osiągnięcia zamierzonego efektu terapeutycznego. Ponadto, stosowanie wysokich dawek leku może przekładać się na nasilenie działań niepożądanych. Pomimo rozwoju wiedzy na temat mechanizmów działania leków na poziomie molekularnym, nadal dużym wyzwaniem jest „umieszczenie” leku w określonej populacji komórek w zakresie stężeń terapeutycznych. Problemy związane z dostarczaniem leku mogą zostać rozwiązane w wyniku modyfikacji struktury chemicznej samego leku, zmiany mikrośrodowiska w miejscu docelowym oraz poprzez opracowanie systemu transportu leku, który ułatwia jego dostarczenie również poprzez kontrolowanie oddziaływania między lekiem, a mikrośrodowiskiem gdzie jest uwalniany. Współczesna nauka wykorzystuje innowacyjne metody dostarczania leków, w tym coraz częściej stosowane nanocząsteczki. Takie nowatorskie podejścia mogą prowadzić do skuteczniejszych form terapii przeciwnowotworowej jak również leczenia wielu innych nieonkologicznych jednostek chorobowych. Jedną z głównych zalet nanosystemów jest ich rozmiar, który umożliwia bardziej precyzyjne dostarczanie leku do komórek. Odpowiednio zaprojektowane nanocząsteczki mogą rozwiązywać problemy zarówno zbyt wysokiej

lipofilności oraz hydrofilowości leków/kandydatów na leki, poprzez wybór odpowiedniego materiału oraz funkcjonalizację powierzchni nanocząsteczek. **W związku z powyższym tematyka badawcza recenzowanej pracy, która dotyczy wykorzystania nanośników oraz kowalencyjnej modyfikacji leku w celu zwiększenia jego dostępności dla komórek i dokomórkowego transportu posiada wysoką wartość poznawczą.**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o cykl związanych tematycznie pięciu prac (jednej pracy przeglądowej oraz czterech prac eksperymentalnych), które zostały opublikowane w latach 2020-2022 w renomowanych czasopismach naukowych. Łączny współczynnik IF cyklu prac wynosi 34,219 (punktacja MEiN 720 punktów). W każdej z wymienionych prac Doktorant jest pierwszym autorem, co wskazuje na znaczący wkład w wykonanie badań, analizę i interpretację otrzymanych danych eksperymentalnych oraz przygotowanie manuskryptów.

Badania związane z pracą doktorską były finansowane w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki OPUS, oraz projektu finansowanego przez międzyrządową instytucję europejską European Cooperation in Science and Technology (COST). Należy podkreślić, że badania były wykonane we współpracy z zagranicznymi ośrodkami naukowymi z Francji, Niemiec, Włoch, oraz Hiszpanii. Ponadto, w wyniku przeprowadzonych badań zostało przygotowane zgłoszenie patentowe nr P.435870 dotyczące sposobu wytwarzania polimersomu zawierającego róż bengalski (RB, ang. rose bengal), oraz możliwości jego zastosowania w terapii fotodynamicznej raka podstawnocomórkowego skóry. **W związku z powyższym można stwierdzić, że wyniki uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej wykraczają poza zakres badań podstawowych. Prowadzone badania mają charakter aplikacyjny i mogą zostać wykorzystane do opracowywania nowych nośników dla zarówno dla leków hydro- i lipofilowych, których zastosowanie jest ograniczone przez problemy związane z niską dostępnością farmaceutyczną i biologiczną. W efekcie jest możliwe uzyskanie poprawy profilu farmakokinetycznego i farmakodynamicznego leków/kandydatów na leki o działaniu przeciwnowotworowym.**

Rozprawa doktorska ma formę autoreferatu na który składa się informacja o źródłach finansowania badań naukowych, wykaz i kopie publikacji naukowych stanowiących podstawę rozprawy, omówienie celu naukowego oraz uzyskanych wyników oraz obserwacji i wniosków, opis dorobku naukowego oraz streszczenia w języku polskim oraz angielskim. Tytuł rozprawy doktorskiej jest zgodny z treścią opublikowanych prac.

Wstęp teoretyczny w zwięzły sposób przedstawia mechanizm terapii fotodynamicznej oraz ograniczenia zastosowania różu bengalskiego jako fotouczulacza. Uzasadnia to wybór różu bengalskiego jako związku modelowego do oceny przydatności zaproponowanych nanosystemów. Uzupełnieniem informacji zawartych we wstępie jest pierwsza praca cyklu rozprawy doktorskiej, w której Doktorant szczegółowo omawia nanonośniki wykorzystywane w terapii fotodynamicznej w modelach *in vitro* oraz *in vivo*. Praca stanowi wprowadzenie do tematyki zastosowania nanotechnologii w celu poprawy aktywności i rozwiązywania problemów ograniczających zastosowanie terapii fotodynamicznej.

Celem pracy było zaprojektowanie nośnika dla rózu bengalskiego, który zwiększy transport dokomórkowy fotouczulacza i poprawi aktywność fotodynamiczną. Do badań wybrano cztery typy nanosystemów: (i) dendrymery fosforowe, pierwszej, drugiej i trzeciej generacji połączone z różem bengalskim na zasadzie kowalencyjnych oddziaływań przy użyciu tyraminy jako linkera (praca 2 z cyklu publikacji); (ii) dendrymery poliamidoaminowe oraz polipropylenoiminowe trzeciej oraz czwartej generacji połączone z fotouczulaczem na zasadzie niekowalencyjnych oddziaływań (praca 3), dendrymersomy składające się z dendronów triazynowo-karbokrzemowych drugiej oraz trzeciej generacji (praca 4), oraz polimersomy zbudowane z kopolimeru blokowego o charakterze amfifilowym (praca 5). Prawidłowo przedstawione założenia pracy i jej cele zostały zrealizowane w odpowiednio zaprojektowanych badaniach eksperymentalnych, które dotyczyły syntezy nośników i ich charakterystyki przy wykorzystaniu standardowych technik analitycznych, oceny właściwości fizykochemicznych, stopnia wydajności enkapsulacji, średnicy hydrodynamicznej, ładunku powierzchniowego potencjału elektrostatycznego, oraz badań biologicznych (generowanie reaktywnych form tlenu, ocena wchłaniania nośników, działanie cytotoksyczne w tzw. fazie ciemnej i jasnej PDT). W przypadku pracy 3 wykonano również badania *in silico* dotyczące tworzenia kompleksów i wpływu kompleksowania na geometrię badanych dendrymerów. Badania w modelu hodowli komórkowych *in vitro* wykonano z wykorzystaniem mysich komórek raka podstawnocomórkowego skóry. Wybór metod badawczych jest prawidłowy i pozwala na zweryfikowanie hipotezy badawczej. Piśmiennictwo zarówno we wstępie teoretycznym jak w poszczególnych pracach cyklu jest dobrane w sposób prawidłowy.

**Należy również podkreślić, że badania prowadzone przez Doktoranta mają charakter interdyscyplinarny, ponieważ dotyczą tematyki różnych specjalności takich jak chemia medyczna, inżynieria farmaceutyczna oraz biologia na poziomie komórki.**

Na podstawie wykonanych badań, Doktorant wykazał, że enkapsulacja rózu bengalskiego w odpowiednim nośniku może zwiększać jego wchłanianie przez komórki nowotworowe. Dodatkowo, zależność uwalniania fotouczulacza od pH środowiska jest niezwykle istotna dla zwiększania selektywności terapii, jak również daje możliwości osiągnięcia wyższych stężeń w określonych kompartmentach komórki np. lizosomach.

Na podstawie analizy zaprezentowanych prac stanowiących rozprawę doktorską, bardzo wysoko oceniam wiedzę specjalistyczną Doktoranta, umiejętność analizy otrzymanych wyników i ich omówienie w zestawieniu z aktualną literaturą w tym temacie. Po zapoznaniu się z publikacjami, chciałabym prosić Doktoranta o odniesienie się do następujących pytań i komentarzy:

1. Dlaczego w pracy wykorzystano jedynie mysie komórki raka podstawnocomórkowego skóry, a nie zostały użyte ludzkie linie tego typu nowotworu?
2. W jaki sposób zostały obliczone wartości  $IC_{50}$  w pracach numer 4 i 5. W pracy numer 4 stężenie RB w badaniach cytotoksyczności wynosiło 0.25  $\mu M$ , 0.5  $\mu M$ , 1  $\mu M$  oraz 2  $\mu M$ , natomiast obliczone wartości  $IC_{50}$  dla wykraczają poza badany zakres stężeń i wynoszą odpowiednio 3.18  $\mu M$ , 5.71  $\mu M$  oraz 3.25  $\mu M$  odpowiednio dla linii AsZ, BsZ oraz CsZ. Podobnie wartość  $IC_{50}$  dla RB dla linii AsZ wynosiła 1.38  $\mu M$  (przy badanych stężeniach 0.25  $\mu M$ , 0.5  $\mu M$ , 0.75  $\mu M$  oraz 1  $\mu M$ ) w publikacji numer 5. W związku z powyższym

chciałabym prosić o doprecyzowanie w jakiś sposób zostały obliczone wartości  $IC_{50}$  dla rózu bengalskiego.

3. Opis dotyczący analizy generowania tlenu singletowego we wszystkich pracach w moim odczuciu nie jest wystarczający. Czy Doktorant mógłby dokładniej opisać jak zostało obliczone generowanie tlenu singletowego? W pracach dotyczących terapii fotodynamicznej najczęściej stosuje się parametr wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego (ang. *singlet oxygen quantum yield*) do określania zdolności generowania tlenu singletowego przez badany związek. W przypadku rózu bengalskiego zgodnie z danymi literaturowymi po naświetlaniu RB (światłem z zakresu 500-580 nm) kwantowa wydajność generowania tlenu singletowego w zależności od użytego rozpuszczalnika wynosi 0.8 dla etanolu i metanolu, 0.75-0.76 dla wody i  $D_2O$ . Z czego może wynikać wzrost generowania tlenu singletowego w pracach 3, 4 oraz 5, jeśli dla samych formułacji („pustych” nośników) nie zaobserwowano zmian w generowaniu tlenu singletowego, co wskazuje na to, że RB jest w tym układzie induktorem powstawania tlenu singletowego, a jego stężenie dla każdej testowanej formułacji jest takie same? Drugie moje pytanie z tego zakresu dotyczy markerów służących do oceny generowania tlenu singletowego. W pracy 2 wykorzystano sondę SOSG, w kolejnych pracach ABDA; z czego wynikała zmiana markera? Ponadto, ABDA może być oczywiście stosowany jako marker fluorescencyjny, natomiast w licznych publikacjach naukowych jest wykorzystywana spektroskopia UV-vis, a wyniki prezentowane w formie zależności absorbancji od czasu. W związku z tym proszę wyjaśnić dlaczego wybrano pomiar fluorescencji?
4. W pracy 2 badano nośniki dla RB połączone w sposób kowalencyjny. Czy w układzie biologicznym po przejściu przez błony biologiczne, ma miejsce rozpad połączenia RB-tyramina? Zakładając, że jest to połączenie stabilne w układzie biologicznym, czy różnice, które wykazano w testach wchłaniania mogą być wytłumaczone faktem, że połączenie RB-Tyr wykazuje niższą intensywność fluorescencji w odniesieniu do samego RB? Wyniki cytometrii przepływowej wskazują na niższą o połowę intensywność fluorescencji G3-3RB w stosunku do RB, ale czy można to interpretować jako obniżone wchłanianie, czy może to również wynikać ze „słabszego” sygnału połączenia TB-tyramina? Czy oprócz pomiaru intensywności fluorescencji określono również procent komórek pozytywnych?
5. Czy badane polimersomy i dendrymersomy są związkami biokompatybilnymi? Czy po „uwolnieniu” leku w komórce, nośnik może zostać usunięty z komórek? A jeśli tak to w jaki sposób? Czy może dochodzić do jego akumulacji, która może przełożyć się na wystąpienie odległych działań niepożądanych albo efektów toksycznych?
6. W badaniach wchłaniania nośników przez komórki nowotworowe, w poszczególnych pracach analizy wykonywano po różnych czasach inkubacji komórek z badanymi nośnikami: w pracy 2 po czasie 0-5h, w pracy 3 i 4 po czasie 0-4h, w pracy 5 po czasie 0-3h. Czym podyktowany był wybór różnych czasów inkubacji oraz jakie kryteria posłużyły do wyboru stężenia  $5\mu M$  do badania wchłaniania RB w układzie komórkowym, jeśli to stężenie nie pojawia się w badaniach cytotoksyczności?

7. W pracach numer 2 i 3 nie podano dawki światła wyrażonej w jednostkach  $J/cm^2$  oraz mocy źródła światła.
8. Dlaczego w badaniach cytotoksyczności, komórki były naświetlane w PBS-ie, a nie w kompletnej pożywce hodowlanej?
9. Działanie cytotoksyczne samego RB w pracach numer 2 i 3 wykazuje pewne różnice. W pracy numer 2, RB w stężeniu  $1 \mu M$  obniżył przeżywalność komórek linii BsZ do około 25-30 %, natomiast w pracy numer 3, RB przy tym samym stężeniu przeżywalność wynosiła ponad 80%. Z czego mogą wynikać różnice w działaniu RB pomiędzy tymi eksperymentami?
10. W pracach pojawia się definicja „idealnego” fotouczulacza, który powinien być aktywowany światłem z zakresu 650-850 nm. Również wśród naukowców zajmujących się terapią fotodynamiczną często wyrażany jest pogląd, że związki absorbujące światło poniżej 630 nm mogą mieć pewne ograniczenia w klinicznej PDT z uwagi na fakt utrudnione przenikanie przez tkanki światła o takiej długości fali. Czy maksimum wzbudzenia dla RB (500-580 nm) może stanowić czynnik limitujący jego kliniczne zastosowanie?
11. Mam również drobną uwagę, która nie wpływa na ocenę wartości pracy i dotyczy sposobu omówienia wyników, które zaczynają się od przedstawienia wyników pracy 3, następnie 2, 5 oraz 4 (numeracja zgodna z wykazem prac). W związku z tym Doktorant mógł konsekwentnie odnieść się do kolejno publikowanych prac, chociaż rozumiem jaki był powód rozpoczęcia omawiania wyników od pracy 3. Pewnym utrudnieniem w ocenie rozprawy doktorskiej jest brak załączenia materiałów dodatkowych (supplementary materials), które były przygotowane dla poszczególnych prac i zamieszczone na serwerach wydawców.

Powyższe pytania nie wpływają na wartość merytoryczną rozprawy i nie zmieniają wysokiego poziomu prowadzonych badań.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia zarówno pod względem formalnym jak i merytorycznym wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim, które określa art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 20 lipca 2018 r., poz. 1668 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne, o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Krzysztofa Sztandery do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Rozprawa doktorska stanowi oryginalne opracowanie naukowe dotyczące aktualnego problemu związanego z dostarczeniem leku do docelowego miejsca działania. Chemia medyczna oferuje tysiące aktywnych struktur, a postęp w technikach biologii molekularnej pozwala na szczegółową analizę mechanizmu działania na poziomie komórki. Jednak bez możliwości dostarczenia leku do miejsca docelowego, nawet najbardziej aktywna w warunkach *in vitro* struktura chemiczna nie pozwoli na uzyskanie oczekiwanej skuteczności w warunkach *in vivo*. Uzyskane wyniki dostarczają tym samym nowej wiedzy na temat nośników takich jak dendrymery, dendrymersomy i polimersomy i możliwości ich zastosowania dla efektywnego

dostarczania leku i kontrolowanego uwalniania, w tym uwalniania zależnego od pH mikrośrodowiska, a najważniejszym osiągnięciem Doktoranta jest opracowanie nośnika dla rózu bengalskiego, który pozwala na poprawę aktywności fotodynamicznej tego związku. Dodatkowo, wyniki badań zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach, co również potwierdza wysoki poziom prowadzonych badań. W związku z powyższym, uwzględniając innowacyjny charakter prowadzonych badań, ich interdyscyplinarność, wysoki poziom naukowy oraz charakter aplikacyjny wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej Pana magistra Krzysztofa Sztandery.

**UNIwersYTET MEDYCZNY**

im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Toksykologii

*Małgorzata Kucińska*

*dr hab. n. farm. Małgorzata Kucińska*