



Recenzja pracy doktorskiej Pana mgra Dariusza T. Młynarczyka pt. „Tribenzoporfirazy o potencjalnym zastosowaniu w terapii fotodynamicznej- synteza i charakterystyka fizykochemiczna”

Recenzowana praca powstała w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu pod kierunkiem prof. dra hab. Tomasza Goślińskiego oraz dra Wojciecha Szczołko. Tematyka badań podjętych przez Doktoranta jest kontynuacją wieloletnich prac nad nowymi związkami makrocyclicznymi do zastosowań biomedycznych prowadzonych na Wydziale Farmaceutycznym UMP.

Jednym z głównych problemów współczesnej medycyny jest obserwowany wzrost oporności wielolekowej (MDR) zarówno na cytostatyki i leki antyproliferacyjne, jak też leki przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Obecny stan wiedzy na temat chorób nowotworowych oraz infekcji bakteryjnych pozwala wnioskować, że do osiągnięcia całkowitego sukcesu terapeutycznego konieczne jest zastosowanie innowacyjnych strategii medycznych działających wielokierunkowo, poprzez zróżnicowane mechanizmy biologiczne, ukierunkowane na zniszczenie nowotworów i patogenów. Do takich rozwiązań należą omawiane w recenzowanej pracy doktorskiej terapia fotodynamiczna nowotworów (PDT) oraz fotodynamiczna inaktywacja mikroorganizmów (PDI). Umiejętne wykorzystanie procesów fotofizycznych oraz reakcji fotochemicznych, jakim ulegają fotosensybilizatory po ich wzbudzeniu promieniowaniem elektromagnetycznym z zakresu widzialnego lub bliskiej podczerwieni, daje możliwość skutecznego leczenia nowotworów i niszczenia drobnoustrojów chorobotwórczych. Właściwymi czynnikami aktywnymi w PDT i PDI są reaktywne formy tlenu (ROS), będące zasadniczo produktami fotoindukowanego przeniesienia elektronu lub/i przekazania energii ze wzbudzonego stanu trypletowego cząsteczek fotosensybilizatora na cząsteczkę tlenu w stanie podstawowym. Możliwość kontrolowanego generowania ROS zależy w dużym stopniu od właściwości chemicznych i fotochemicznych zastosowanych fotosensybilizatorów. Prowadzone są intensywne poszukiwania nowych związków absorbujących promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni, charakteryzujących się zwiększoną selektywnością wobec komórek nowotworowych/bakteryjnych, efektywnością w generowaniu zarówno tlenu singletowego jak i wolnych rodników tlenowych (anionorodnik



ponadtlenkowy, rodniki hydroksylowe) oraz dużą skutecznością terapeutyczną. Praca doktorska mgra Dariusza Młynarczyka wpisuje się w ten nurt poszukiwań i dotyczy ważnego i interdyscyplinarnego kierunku badań. Doktorant wykazał się znajomością zagadnień z zakresu syntezy organicznej, spektroskopii molekularnej, fotochemii i fotobiologii. Przedstawiony do oceny materiał doświadczalny jest obszerny, a jego powstanie nie byłoby możliwe bez wieloletniej współpracy zespołów naukowych posiadającymi duże doświadczenie badawcze w różnych dziedzinach i dysponującymi zaawansowaną, specjalistyczną aparaturą naukową.

Rozprawa doktorska zatytułowana „*Tribenzoporfirazy o potencjalnym zastosowaniu w terapii fotodynamicznej- synteza i charakterystyka fizykochemiczna*” została zredagowana na 120 stronach maszynopisu i składa się z 12 rozdziałów, przy czym trzy ostatnie rozdziały to spis rysunków, schematów, tabel i cytowanej literatury (129 pozycji) oraz suplement zawierający widma NMR badanych związków. Praca ma typowy dla opracowań z zakresu chemii organicznej format i zawiera: i) krótki wstęp; ii) rozdział, w którym Doktorant definiuje cele badań; iii) część literaturową; iv) rozdział poświęcony omówieniu wyników badań oraz ich analizie i dyskusji; v) podsumowanie rozprawy i zwięzłe sformułowane wnioski; vi) część doświadczalną zawierającą opis stosowanych materiałów, metod badawczych i procedur. Merytoryczną część rozprawy kończy streszczenie w języku polskim i angielskim.

Przedstawione przez Autora cele pracy doktorskiej zostały jasno i poprawnie sformułowane i są adekwatne do podjętego tematu rozprawy. Główną koncepcją pracy jest synteza organiczna i charakterystyka spektroskopowa nowych pochodnych sulfanylotribenzoporfirazy i azotowych tribenzoporfirazy modyfikowanych podstawnikami peryferyjnymi, m. in. dendrymerami. Ponadto celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie, w jaki sposób przeprowadzona modyfikacja fotosensybilizatorów wpływa na wybrane właściwości fizykochemiczne (agregacja, fotogenerowanie tlenu singletowego) i aktywność biologiczną warunkującą ich zastosowanie w terapii fotodynamicznej nowotworów i fotodynamicznej inaktywacji mikroorganizmów.

W części literaturowej Autor przedstawia aktualny stan wiedzy na temat metod syntezy i właściwości fizykochemicznych porfirazy. Omówione są tu między innymi problemy związane z izolacją tej grupy związków, oceną ich reaktywności i możliwościami potencjalnych aplikacji. Dodatkowo, na podstawie wnikliwego przeglądu literaturowego, Autor zebrał informacje na temat sposobów funkcjonalizacji dendrymerów i ich wykorzystaniem w PDT. Do najważniejszych właściwości dendrymerów Doktorant zaliczył minimalizację zjawiska agregacji oraz ułatwienie transportu leków, w



tym leków przeciwnowotworowych i przeciwbakteryjnych. Następnie mgr Młynarczyk scharakteryzował istotę terapii fotodynamicznej zwracając uwagę na właściwości fizykochemiczne i biologiczne fotosensybilizatorów pierwszej, drugiej i trzeciej generacji. Pokróćce omówione są konsekwencje fotowzbudzenia fotosensybilizatorów, przy czym Doktorant zwraca uwagę na znaczenie efektywnego fotogenerowania tlenu singletowego dla skutecznej terapii fotodynamicznej nowotworów. Niestety opisany został tu jedynie mechanizm typu II (przekazanie energii ze wzbudzonego fotosensybilizatora na cząsteczkę tlenu). Szkoda, że mechanizm typu I polegający na przeniesieniu elektronu lub atomu wodoru został pominięty, gdyż według mojej wiedzy ma on zasadniczy wpływ na sukces terapii w warunkach *in vivo*. W kolejnej części została krótko opisana fotodynamiczna chemioterapia skierowana przeciwko drobnoustrojom (PACT). Zgadzam się ze stwierdzeniem, że dużym atutem fotodynamicznej inaktywacji jest brak możliwości wykształcenia mechanizmów oporności na tlen singletowy, jednak zabrakło mi głębszego rozwinięcia tej problematyki. Następnie zostały opisane potencjalne zastosowanie azaporfinoidów w terapii fotodynamicznej, fotodiagnostyce i diagnostyce metodą rezonansu magnetycznego. Kolejny podrozdział dotyczy możliwości wykorzystania dendrymerów w PDT, w szczególności w celu zwiększenia rozpuszczalności fotosensybilizatorów oraz ich zastosowanie jako promotorów przejścia przezskórnego. Część literaturową kończy krótkie podsumowanie. Uważam, że wstęp literaturowy jest świadectwem dobrego przygotowania teoretycznego Doktoranta do realizacji zróżnicowanych badań. Materiał ten został opracowany w sposób zwięzły i zrozumiały i zawiera jedynie drobne nieścisłości. Na stronach 1 i 32 Doktorant niepoprawnie definiuje tlen singletowy, jako czynnik fizyczny, podczas gdy jest to jedna ze wzbudzonych form tlenu cząsteczkowego. Autor pisze też o terapiach opartych na tlenie singletowym, a być może lepiej mówić o terapiach wykorzystujących zjawisko stresu oksydacyjnego, w którym nie tylko tlen singletowy, ale też inne reaktywne formy tlenu (anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenuk wodoru, rodnik hydroksykowy) odgrywają kluczową rolę. Rysunek 21 jest mało czytelny, być może lepiej byłoby tu przedstawić elektronowe widma absorpcyjne wybranych endogennych chromoforów oraz widma stosowanych fotosensybilizatorów. Z kolei do rysunku nr 23 przedstawiającego struktury fotosensybilizatorów, wkradł się z pozoru drobny błąd. Redaporfin należy do grupy bakteriochloryn, a nie jest jak przedstawiono na rysunku chloryną. Zamiast jednego zredukowanego pirolu powinny być dwa zredukowane pirole po przeciwnej stronie makrocyklu.

Rozdział czwarty zawiera opis przeprowadzonych syntez, charakterystykę fizykochemiczną opisanych związków oraz ocenę aktywności biologicznej wybranych tribenzoporfirazy. Przebieg prowadzonych reakcji kontrolowano za pomocą pomiaru widm absorpcyjnych, a czystość otrzymanych



produktów potwierdzono metodą spektrometrii mas (MS) oraz jądrowego rezonansu paramagnetycznego (NMR). W wyniku reakcji cyklotetrameryzacji odpowiednich pochodnych maleonitrylowych uzyskano tribenzoporfiryny siarkowe, diazepinoporfirazyne oraz pirazynoporfirazyne. Otrzymano również pochodne tribenzoporfirazyne na drodze modyfikacji peryferium makrocykla. Mimo napotkanych trudności w charakterystyce fizykochemicznej, w szczególności metodą NMR, to właśnie wnikliwa analiza i interpretacja widm NMR oraz widm masowych zasługuje na docenienie. Kolejnym etapem było zbadanie zjawiska agregacji badanych tribenzoporfirazyne. Rozbudowa części peryferyjnej tribenzoporfirazyne doprowadziła do poprawy ich rozpuszczalności jak również zmniejszenia zjawiska agregacji. W celu wyznaczenia wydajności kwantowych generowania tlenu singletowego, Autor posłużył się metodą pośrednią z zastosowaniem 1,3-difenyloizobenzofuranu (DPBF). Badane związki charakteryzują się zróżnicowaną tendencją do generowania tlenu singletowego (wydajności kwantowe wynosiły od 5% do 27%). Największą wartość wydajności kwantowej uzyskano dla pochodnej **14** ($\Phi_{\Delta}=27\%$), co autor poprawnie tłumaczy oksydacyjnym otwarciem pierścienia porfirazyne. Szkoda, że pomiary zaniku absorpcji DPBF były jedyną metodą wyznaczenia wydajności kwantowych $^1\text{O}_2$. Pomiary polegające na bezpośredniej detekcji fosforescencji tlenu singletowego przy długości fali 1270 nm w różnych rozpuszczalnikach znacznie wzbogaciłyby część fotochemiczną pracy. Zastanawiam się też jak wyznaczone wartości Φ_{Δ} mają się do procesów zachodzących w komórkach nowotworowych/bakteryjnych. Być może warto też przemyśleć rozszerzenie tych badań o pomiary detekcji innych ROS t. j. anionorodnika nadtlenkowego czy rodnika hydroksylowego.

Do oceny właściwości biologicznej *in vitro* wybrano sześć zsyntezowanych związków. Pierwszy etap badań biologicznych dotyczył określenia fotocytotoksyczności badanych związków wobec komórek raka koleczystokomórkowego jamy ustnej (HSC-3 i Cal 27) oraz raka jajnika (HeLa). Fotosensybilizatory dostarczano do komórek albo w postaci 0.1 % roztworów DMSO lub w postaci liposomalnej. Zastosowane liposomy okazały się skutecznymi nośnikami badanych związków, gdyż pozwoliły na uzyskanie stabilnych i biokompatybilnych formułacji. W zależności od zastosowanego składu formułacji, liposomy zwiększały lub zmniejszały fotocytotoksyczność badanych związków. Ponadto wykazano, że aktywność badanych związków *in vitro* jest zależna od wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego, jednak nie zawsze jest to zależność liniowa. Z przedstawionych wyników badań wynika, że pochodna **12** prowadzi do największego efektu fotodynamicznego *in vitro*. Przedstawione w pracy wyniki badań biologicznych przeprowadzone na komórkach nowotworowych można traktować jako badanie pilotażowe. Bardzo ciekawe byłoby uzupełnienie tych badań o określenie zależności przeżywalności



komórkowej w zależności od dawki światła, a wyniki badań w warunkach hipoksji i normoksji można by skorelować z mechanizmami generowania różnych reaktywnych form tlenu *in vitro*.

Ostatni podrozdział *Wyników i Dyskusji* to badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybranych związków wobec szczepów bakterii gram dodatnich (*S. aureus*), gram ujemnych (*E. coli*) oraz grzybów (*Candida albicans*). Najlepsze wyniki uzyskano dla pochodnych **6** i **12** wobec bakterii gram dodatnich *S. Aureus*, gdyż odnotowano spadek przeżywalności bakterii o około sześć logarytmów. Autor prawidłowo zauważa, że różnice w aktywności fotodynamicznej badanych związków wobec bakterii gram dodatnich i gram ujemnych oraz grzybów związane są z różnicami w budowie ścian komórkowych i łatwiejszym wnikaniem tych fotosensybilizatorów do komórek bakterii gram dodatnich niż gram ujemnych i grzybów.

Pomimo iż dyskusja otrzymanych wyników przeprowadzona jest w sposób szczegółowy i dojrzały, zabrakło mi w niej porównania uzyskanych w pracy wyników z analogicznymi wynikami badań nad fotosensybilizatorami stosowanymi w praktyce klinicznej.

Do najważniejszych osiągnięć uzyskanych przez mgra Dariusza Młynarczyka zaliczam:

- Syntezę biblioteki związków należących do grupy tribenzoporfirazyń oraz ich charakterystykę fizykochemiczną z wykorzystaniem technik elektronowej spektroskopii absorpcyjnej, jądrowego rezonansu paramagnetycznego (NMR) oraz spektrometrii mas (MS).
- Wyznaczenie wydajności kwantowych generowanie tlenu singletowego dla dziewięciu otrzymanych związków oraz zbadanie aktywności biologicznej wybranych fotosensybilizatorów (w postaci wolnej jak i w formułacjach liposomalnych) wobec komórek nowotworowych trzech linii komórkowych (HSC-3, CAL27, HeLa) w warunkach normoksji i hipoksji.
- Wykazanie, że pochodne **12** i **6** są skutecznymi fotosensybilizatorami w fotodynamicznej inaktywacji bakterii gram dodatnich (po wzbudzeniu badane pochodne generują efektywnie ROS, prowadząc do obniżenia ilości komórek *S. aureus* o 6 rzędów logarytmicznych).

Przedstawioną do oceny pracę oceniam bardzo wysoko. Praca została napisana językiem poprawnym i zrozumiałym. Oprócz dobrej znajomości syntezy organicznej i technik spektroskopowych, Doktorant wykazał się umiejętnością współpracy z różnymi zespołami badawczymi. Uważam, że sama



zaawansowana synteza 12 nowych związków makrocyklicznych oraz ich charakterystyka spektroskopowa w zupełności wystarczy do nadania stopnia doktora nauk farmaceutycznych. Jednak dodatkowe badania biologiczne pozwalają Autorowi spojrzeć w szerszy sposób na problematykę PDT i w istotny sposób wzbogacają przedstawioną do oceny dysertację.

Na wyróżnienie zasługuje fakt, iż wyniki badań wchodzących w zakres rozprawy opublikowano w postaci pięciu pełnotekstowych artykułów w bardzo dobrych czasopismach naukowych specjalizujących się w publikacji interdyscyplinarnych wyników badań (*Eur. J. Med. Chem.*, *New J. Chem.*, *J. Inorganic Biochem.*, *ChemPlusChem*). Warto dodać, że praca, w której Doktorant jest pierwszym autorem: *Dendrimeric Sulfanyl Porphyrazines: Synthesis, Physico-Chemical Characterization, and Biological Activity for Potential Applications in Photodynamic Therapy*, była już cytowana 16 razy. Ponadto autor realizuje projekty badawcze finansowane przez Narodowe Centrum Nauki (NCN), których wyniki zostały zamieszczone w ocenianej rozprawie.

Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa prezentuje wysoki poziom badań i zawiera elementy nowości naukowej. Na podkreślenie zasługuje umiejętność wykorzystania zdobytej wiedzy teoretycznej do praktycznego rozwiązywania skomplikowanych problemów naukowych w zakresie interdyscyplinarnej tematyki. Większość zarzutów, które podniosłem w niniejszej recenzji należy traktować jako zaproszenie do dyskusji podczas obrony doktorskiej, nie zaś jako istotne błędy merytoryczne wpływające na końcową ocenę dysertacji. Uważam, że jest to wartościowa praca, zawierająca obszerny materiał doświadczalny o niewątpliwiej wartości naukowej, który w przyszłości może znaleźć zastosowanie praktyczne. Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego we Wrocławiu o dopuszczenie Pana mgra Dariusza Młynarczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Janusz M. Dąbrowski, prof. UJ