



Lublin, 2019-05-22

Ocena pracy doktorskiej mgr Dariusza T. Młynarczyka pt. „Tribenzoporfirazyiny o potencjalnym zastosowaniu w terapii fotodynamicznej – synteza i charakterystyka fizykochemiczna”

Rak staje się głównym zabójcą XXI wieku. Choroby nowotworowe są obecnie drugą najważniejszą przyczyną śmiertelności populacji w krajach rozwiniętych a liczba nowych przypadków zachorowań wyraźnie rośnie. W większości krajów, w tym w Polsce, na pierwszym miejscu w takim rankingu znajdują się choroby układu krążenia, jednak nie obserwuje się w tym przypadku jakiejś znacznej dynamiki wzrostu śmiertelności. W związku z tym jednym z najważniejszych zadań współczesnej chemii leków jest poszukiwanie i projektowanie nowych rozwiązań terapeutycznych, które mogą stanowić kolejne elementy strategii opanowania epidemii chorób nowotworowych. Niewątpliwie w tym spektrum znajdują się propozycje tzw. terapii fotodynamicznych: do komórek dostarczany jest nietoksyczny czynnik chemiczny, który pod wpływem promieniowania przekształca cząsteczki trypletowe tlenu w silnie toksyczny wariant singletowy *in situ*. Takie podejście ma wiele potencjalnych zalet: zasięg działania terapeutycznego ograniczony jest jedynie do komórek/tkanek poddanych naświetlaniu zaprojektowaną długością fali a odczynnik fotodynamiczny można dodatkowo poddać specyficznym modyfikacjom, które zapewnią jego kumulację w docelowych komórkach zmienionych nowotworowo.

Praca doktorska mgr. Dariusza Młynarczyka dotyczy właśnie zaprojektowania serii nowych pochodnych tribenzoporfirazyn peryferyjnie funkcjonalizowanych układami dendrymerowymi o potencjalnym zastosowaniu jako fotosensybilizatory. Autor w swojej pracy opisał drogi syntezy dwunastu sulfanylowych lub azotowych pochodnych tribenzoporfirazyn, następnie dokonał oceny w jaki sposób ich struktura a w szczególności peryferyjna funkcjonalizacja makrocykli wpływa na rozpuszczalność, agregację oraz wydajność kwantową generowania tlenu singletowego. Na końcu zweryfikował przydatność otrzymanych substancji w eksperymentach terapii fotodynamicznej *in vitro*. W wyniku tych prac zidentyfikowano pochodną **12** jako najbardziej aktywną w indukowaniu fototoksyczności wobec modelowych linii komórek nowotworowych (IC_{50} na poziomie $0.1 \mu M$), dwie pochodne, **6** i **12** wykazały się znaczącą fotoaktywnością skierowaną przeciw drobnoustrojom *S. aureus*. Na podstawie zaobserwowanych wyników przedstawiono zależności struktura – aktywność



analizowanych pochodnych pod względem ich aktywności biologicznej ale również wydajności generowania tlenu singletowego czy innych właściwości fizykochemicznych co bez wątpienia jest ważnym osiągnięciem i wkładem naukowym Doktoranta ale będzie miało również duże znaczenie w projektowaniu kolejnych prac prowadzonych w tym obszarze.

Przedstawiona do oceny dysertacja jest bardzo dobrze zaprojektowana, zredagowana i udokumentowana. Ma tradycyjny układ, składa się z trzech dominujących elementów: obszernej części literaturowej stanowiącej dogłębną przegłąd wiedzy na temat porfirynoidów, dendrymerów oraz wykorzystania takich struktur w terapiach fotodynamicznych; części przedstawiającej wyniki własne i ich dyskusję oraz części doświadczalnej opisującej zastosowane procedury, odczynniki, drogi syntezy czy metodykę badań biologicznych *in vitro*. Autor rozpoczyna swoją dysertację od klarownego przedstawienia celu pracy a kończy spisem literatury (zawierającym 129 pozycji, z czego 108 zostało opublikowanych w XXI wieku) oraz suplementem zawierającym ryciny widm NMR jako weryfikację strukturalną zsyntezowanych związków. Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań zostały przedstawione w bardzo przemyślany, systematyczny i kompletny sposób i dobrze korespondują ze zdefiniowanym wcześniej celem pracy. Badania mają charakter zespołowy i interdyscyplinarny; autor rzetelnie opisał udział poszczególnych współpracowników w wykonaniu konkretnych pomiarów czy analiz niezbędnych do powstania kompletnej pracy. Nie pozostawia to jednak wątpliwości, że to mgr Dariusz Młynarczyk jest główną siłą napędową całego projektu i pełnił wiodącą rolę w zaprojektowaniu koncepcji badań, wykonania syntez oraz charakterystyki strukturalnej i fizykochemicznej związków oraz czynnie uczestniczył w powstaniu pozostałych wyników. Chciałbym dodatkowo zwrócić uwagę na wyjątkowe zdolności edukacyjne i edytorskie doktoranta; autor dysertacji przeprowadza czytelnika przez zawłości bardzo przecież skomplikowanej i wielodyscyplinowej materii klarownym i przystępnym językiem oraz przy pomocy świetnie dobranych i zaprojektowanych ilustracji.

Oczywiście jak w każdej tego typu pojawiły się pewne niedociągnięcia i z obowiązku recenzenta chciałbym omówić kilka najważniejszych. Uważam za nie do końca szczęśliwe sformułowanie przedstawione na str. 26 „...Niestety tlen singletowy charakteryzuje się bardzo krótkim czasem życia i niemożliwe jest jego przechowywanie...”. Reaktywne formy tlenu są wysoce cytotoksyczne i to bardzo dobra okoliczność, że istnieją w komórkach w naprawdę śladowych ilościach. Podstawową ideą terapii fotodynamicznych jest właśnie inteligentne wytworzenie czynnika toksycznego w kontrolowanych warunkach jedynie w miejscach gdzie jest potrzebny – w komórkach nowotworowych, komórkach patogennych mikroorganizmów czy pasożytów. Podobnie nie mogę zgodzić się ze sformułowaniem iż rozdzielenie regioizomerów *cis*- i *trans*- jest „często niemożliwe, nawet przy użyciu najbardziej zaawansowanych metod separacji jak chromatografia wykluczenia” (str. 10). Każdy rodzaj chromatografii ma swoje spektrum zastosowań a *size exclusion*



chromatography zdecydowanie nie jest optymalną metodą rozdziału regioizomerów, które przecież na ogół nie różnią się rozmiarem cząsteczkowym. Należy oczekiwać, że izomery mogą bardziej różnić się polarnością albo rozkładem przestrzennym powierzchni lipofilowych co można wykorzystać stosując w chromatografii odpowiednie układy faz stacjonarnych, np. RP-HPLC czy HILIC. Z drobnych rzeczy: Ryc. 21 (str. 28) zawiera błędne oznaczenie sugerujące, że zakres promieniowania UV kończy się na wartości 0 nm; a sformułowanie o pojawieniu się „chiralności centrosymetrycznej węgla” (str. 21) jest nieprecyzyjnym i niepotrzebnym komplikowaniem faktu pojawienia się asymetrycznego atomu węgla.

Dodatkowo chciałbym sformułować dwa pytania, które pozwolą doprecyzować znaczenie uzyskanych wyników biologicznych i liczę, że uzyskam odpowiedź doktoranta podczas obrony:

- 1) jakie zakresy stężeń przyjęto w celu uzyskania wartości IC_{50} aktywności fotodynamicznej przedstawione w rozdziale 4.5? Czy fakt ograniczonej rozpuszczalności badanych związków miał wpływ na ten zakres? Chętnie zobaczę przykładową krzywą dawka – efekt dla wybranej substancji w warunkach fotodynamicznego kontrolowania wzrostu komórek nowotworowych.
- 2) w badaniach biologicznych zastosowano kilka sposobów solubilizacji badanych substancji (dodatek DMSO, formulacje liposomalne). Czy przeprowadzono eksperymenty kontrolne, które oceniałyby wpływ samych solubilizatorów na proliferację komórek nowotworowych lub drobnoustrojów?

Powyższe uwagi i pytania nie wpływają na bardzo wysoką ocenę dysertacji przedstawionej do recenzji. W mojej opinii praca doktorska pt. „*Tribenzoporfirazy o potencjalnym zastosowaniu w terapii fotodynamicznej – synteza i charakterystyka fizykochemiczna*” została wykonana prawidłowo, jest bardzo dobrze zredagowana i udokumentowana a jej efektem są nowatorskie struktury chemiczne, które stanowią istotny wkład w rozwój chemii fotosensybilizatorów. Część wyników przedstawionych w dysertacji została opublikowana w periodyku *ChemPlusChem* 2016;81: 460-470, gdzie doktorant jest pierwszym autorem artykułu. Tym samym dysertacja spełnia wszystkie wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim przez stosowne akty prawne. Z przyjemnością wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr. Dariusza T. Młynarczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,


prof. dr hab. Krzysztof Józwiak