

dr hab. Marcin Kołaczkowski, prof. UJ
Zakład Chemii Leków, Katedra Chemii Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Ocena

pracy doktorskiej pt. „Synteza i charakterystyka fizykochemiczna podstawionych aminoporfirazyn i diazepinoporfirazyn o potencjalnej aktywności biologicznej”, wykonanej przez mgr Ewelinę Wieczorek, absolwentkę studiów doktoranckich, w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, pod kierunkiem prof. dr hab. Tomasza Goślińskiego – promotora i dr Jarosława Piskorza – promotora pomocniczego.

Pomimo niekwestionowanego rozwoju nauki i ogólnego postępu cywilizacyjnego, szereg chorób trapiących ludzkość od wieków, nadal pozostaje wyzwaniem. Szczególną pozycję w tym względzie zajmują choroby nowotworowe, będące wciąż „zabójcą numer jeden” i dlatego też stanowiące jeden z głównych nurtów tematycznych w poszukiwaniu nowych leków. Warto przy tym podkreślić, że z uwagi na różnorodność natury biologicznej chorób nowotworowych, a także heterogenność populacji pacjentów, najprawdopodobniej nigdy nie powstanie mityczny „lek na raka”, a jedynie poszerzy się, miejmy nadzieję znacznie, armamentarium różnego rodzaju terapii, skutecznie zwalczających poszczególne rodzaje nowotworów. Konieczne są w tym względzie wielokierunkowe badania naukowe, stanowiące zarówno źródło inspiracji dla możliwych mechanizmów działania, jak i nowych rozwiązań technologicznych, mogących w przyszłości znaleźć zastosowanie terapeutyczne. W nurt tych badań doskonale wpisuje się tematyka prac naukowych prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, pod kierunkiem prof. Tomasza Goślińskiego. Będące ich przedmiotem wielowątkowe badania nad nowymi substancjami o charakterze fotosensybilizatorów, zajmują istotną pozycję w poszukiwaniu skuteczniejszych rozwiązań w zakresie terapii fotodynamicznej. Terapia fotodynamiczna znalazła już ugruntowaną pozycję w leczeniu niektórych schorzeń, takich jak trądzik, czy zwyrodnienie plamki żółtej, a także niedrobnokomórkowego raka płuc czy raka przełyku. Wciąż jednak drzemie w niej wielki

potencjał dla znacznie szerszego zastosowania, co wymaga jednak opracowania nowych, skuteczniejszych i dostosowanych do odpowiednich warunków, fotosensybilizatorów.

W tym kontekście, przyjętą tematykę pracy należy ocenić jako w pełni uzasadnioną. Co więcej, należy podkreślić, iż prace wykonane przez mgr E. Wieczorek stanowią rozwinięcie ugruntowanej już w Zakładzie tematyki, oparte są o wysokiej klasy warsztat badawczy i wpisują się dobrze w szerszy nurt badań, realizowanych w zespole prof. Goślińskiego.

Oceniana rozprawa doktorska została przedstawiona jako cykl 4 publikacji oryginalnych wraz z liczącym 51 stron autoreferatem, stanowiącym bardzo dobry przewodnik i komentarz dla załączonych prac. Rozprawa ma przejrzysty układ, który pozwala efektywnie zapoznać się z omawianymi zagadnieniami. Zamieszczony przed autoreferatem wykaz skrótów oraz szczegółowy, acz przejrzysty spis treści, stanowią dobre wprowadzenie do lektury dalszych rozdziałów. Zamieszczona na początku autoreferatu sylwetka naukowa Doktorantki wyczerpująco informuje o jej wykształceniu i doświadczeniu zawodowym oraz osiągnięciach naukowych. Na szczególną uwagę zwraca bardzo rzetelne określenie wkładu Doktorantki w powstanie materiału stanowiącego podstawę rozprawy, a także jasne określenie roli wszystkich współautorów, co dodatkowo poparte jest zamieszczeniem stosownych oświadczeń, na końcu pracy. Tak poważne i szczegółowe potraktowanie tego tematu zasługuje na najwyższe uznanie i może stanowić przykład prawidłowego postępowania w przypadku prac doktorskich opartych o publikacje wieloautorskie. Multidyscyplinarność badań jest bowiem w dzisiejszych czasach wymogiem i wartością, ale w przypadku prac awansowych, konieczna jest również możliwość precyzyjnej oceny realnego wkładu kandydata. W przypadku ocenianej rozprawy, istotny wkład Doktorantki w powstanie materiału stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej, nie pozostawia wątpliwości i zasługuje na uznanie. Pełniła ona wiodącą rolę w zakresie syntezy i analizy otrzymanych połączeń, a także dokonała analizy zależności struktura-właściwości i struktura-aktywność oraz opisała otrzymane wyniki. Co więcej, Doktorantka nie tylko przedyskutowała, ale także wykonała część badań biologicznych, co dodatkowo poszerza jej warsztat i z pewnością pozwala lepiej zrozumieć badania wykonywane dla otrzymywanych przez nią związków. Całościowy dorobek naukowy Doktorantki jest bardzo spójny tematycznie, a jej wiodąca rola w jego powstaniu jest również ewidentna. Doktorantka jest bowiem pierwszym autorem we wszystkich 4 publikacjach oryginalnych. Wszystkie prace są anglojęzyczne, ogłoszone w czasopismach o cyrkulacji międzynarodowej, uwzględnionych na liście A. Ich sumaryczny współczynnik oddziaływania *impact factor* wynosi 9,394 (wg JCR), liczba cytowań 9, a indeks Hirscha 2. Całość dopełnia także udział w 27 konferencjach naukowych, w większości międzynarodowych, udział w 3 grantach badawczych oraz staże

naukowe. Biorąc pod uwagę początkowy etap kariery młodego naukowca, osiągnięcia te należy ocenić jako znaczące i dające nadzieję na dalszy, dynamiczny rozwój.

W zamieszczonym kolejno wstępie teoretycznym, Doktorantka klarownie naświetliła podłoże poruszanej problematyki, a w szczególności istotę terapii fotodynamicznej oraz charakterystykę fotosensybilizatorów z grupy porfirazyn. Wykonany przegląd piśmiennictwa rzetelnie opisuje dokonania poprzedników oraz płynnie wprowadza w zagadnienia stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej. W końcowym akapicie części wstępnej Doktorantka precyzuje obszar prac badawczych, który jej zdaniem wymaga eksploracji, wskazując na istnienie luki w zakresie rozbudowy peryferyjnej diazepinoporfirazyn, a także pojawienie się nowych możliwości badań fizykochemicznych i biologicznych.

Pewnym zaskoczeniem było dla mnie zamieszczenie następnie rozdziału „Przedmiot badań i zastosowana metodyka”, który dość szczegółowo opisuje już metodykę prowadzonych prac. Dynamika prowadzonej dotąd narracji wskazywała raczej, że w tym miejscu zamieszczony powinien zostać rozdział „Cel pracy”, wprowadzający w koncepcję i zakres przeprowadzonych badań, a dopiero następnie metody badawcze użyte do realizacji tych celów. Być może jest to następstwo przyjętego na Uniwersytecie schematu, niemniej jednak wydaje się, że zmiana kolejności tych rozdziałów ułatwiłaby zapoznawanie się z treścią rozprawy. Jest to oczywiście jedynie subiektywna uwaga natury redakcyjnej, która nie wpływa na ocenę merytoryczną zamieszczonych treści. Oba wspomniane rozdziały spełniają bowiem bez zastrzeżeń swoją rolę, informując rzetelnie, odpowiednio o zastosowanej metodyce, jak i o zdefiniowanych celach szczegółowych.

Doktorantka określiła przedmiot swoich badań, jako „otrzymanie nowych związków porfirynoidowych z grupy diazepino- i aminoporfirazyn, o jak najlepszych parametrach generowania tlenu singletowego, celem oceny fotocytotoksyczności i potencjalnego zastosowania w terapii fotodynamicznej.” Analizując kolejne rozdziały, systematycznie streszczające badania zrealizowane w ramach cyklu 4 publikacji, należy stwierdzić, że cel ten został w pełni zrealizowany.

I tak, w publikacji **„Synthesis, characterization and photophysical properties of novel 5,7-disubstituted-1,4-diazepine-2,3-dicarbonitriles”** ogłoszonej w 2016 roku w Journal of Molecular Structure, opisana została synteza i badania fizykochemiczne 3 nowych dikarbonitrylowych pochodnych 1,4-diazepiny, z różnie podstawionymi ugrupowaniami styrylowymi. Związki te planowano użyć do otrzymania odpowiednich makrocykli porfirazynowych, dekorowanych w części peryferyjnej nowymi ugrupowaniami o rozbudowanej, strukturze dendrymerycznej. Związki te nie poddały się efektywnej

makrocyklizacji, niemniej jednak wykazały bardzo ciekawe właściwości w badaniach fotofizycznych, co wskazuje, że podjęcie ich dalszych badań było uzasadnione. Nasunęło mi się w tym miejscu pytanie, czy Doktorantka zastanawiała się dlaczego, mimo pozornie odpowiedniej struktury substratów, makrocyklizacja się nie powiodła?

Próba efektywnego otrzymania rozbudowanych pochodnych diazepinoporfirazynowych, w wyniku kondensacji odpowiednio podstawionych diazepinodikarbonitryli została opisana w publikacji **„First Example of a Diazepinoporphyrizine with Dendrimeric Substituents”**, która ukazała się w 2017 roku w czasopiśmie Tetrahedron Letters. Już sam tytuł artykułu zdradza sukces, który udało się osiągnąć, przeprowadzając z proces makrocyklizacji. Co godne uwagi, uzyskane osiągnięcie, zostało dodatkowo wyróżnione przez redakcję czasopisma umieszczeniem abstraktu graficznego artykułu na okładce wydania. Użyte tym razem substraty diazepinodikarbonitrylowe różniły się nieco strukturą od opisanych w poprzedniej publikacji, zawierając podstawniki fenyłowe, zamiast styrylowych. Zaletą takiej wymiany okazała się bezdyskusyjnie zdolność do makrocyklizacji. Powstaje jednak pytanie, jaką rolę mógł pełnić fragment etenyłowy zaplanowany pierwotnie w publikacji nr 1, a wyeliminowany w publikacji nr 2? (styryl vs. fenyl). Jak jego obecność mogła wpłynąć na właściwości? Otrzymana pochodna diazepinoporfirazynowa (oznaczona w autoreferacie nr 15) wykazała wysoką wydajność kwantową generowania tlenu singletowego ($\Phi_{\Delta} = 0,295$) i mogła być rozważana jako potencjalny fotouczulacz do zastosowania w terapii fotodynamicznej. Pozytywne wyniki uzyskane w niniejszej pracy, stały się punktem wyjścia do dalszych badań nad otrzymywaniem i charakterystyką dendrymerycznych pochodnych diazepinoporfirazyn.

Kolejny artykuł **„Photophysical properties and photocytotoxicity of free and liposome-entrapped diazepinoporphyrizines on LNCaP cells under normoxic and hypoxic conditions”**, opublikowany w roku 2018 w European Journal of Medicinal Chemistry, stanowi bardzo mocną pozycję w cyklu prac składających się na rozprawę doktorską. Obejmuje on syntezę dwóch pochodnych porfirazynowych, jednej symetrycznej tetradiazepinoporfirazyny (oznaczonej w autoreferacie nr 16) i jednej niesymetrycznej tribenzomonodiazepinoporfirazyny (oznaczonej w autoreferacie nr 17), obu zawierających przy układzie diazepiny podstawniki 4-metoksyfenylowe. Związki te otrzymano z wykorzystaniem metodyki opracowanej w poprzedniej publikacji. W pracy zawarto również ich szeroką charakterystykę fizykochemiczną oraz badania biologiczne, obejmujące także opublikowaną wcześniej pochodną 15. Badania fizykochemiczne uwzględniały pomiary absorpcji i emisji, badania agregacji oraz generowania tlenu singletowego. Badania biologiczne objęły testy

cytotoksyczności względem komórek nowotworowych (w warunkach normoksji i hipoksji) oraz badanie aktywności przeciwbakteryjnej. Z uwagi na niską rozpuszczalność badanych pochodnych w wodzie, otrzymano ich formułacje liposomalne i w takiej formie poddano badaniom aktywność biologiczną. Dla pochodnej **17**, z uwagi na jej relatywnie wyższą rozpuszczalność w wodzie, wykonano także badanie w postaci wolnej. Zaobserwowano istotny wpływ agregacji pochodnych **15** i **16** na obniżenie ich zdolności do generacji tlenu singletowego, podczas gdy pochodna **17** nie podlegała agregacji. Ciekawym wydaje się fakt, iż nawet podlegając agregacji, pochodna **16** wykazała nieco wyższą zdolność do generacji tlenu singletowego od pochodnej **17** ($\Phi_{\Delta} = 0.078$ vs. 0.069 w DMF i 0.249 vs. 0.180 w DMSO), podczas gdy w badaniach biologicznych, to pochodna **17** wykazała wyraźnie wyższą aktywność cytotoksyczną, zarówno wobec komórek nowotworowych, jak i bakteryjnych. I tu chciałbym zapytać o opinię Doktorantki na temat możliwego podłoża tych różnic w aktywności, czy są one wyłącznie skutkiem obniżonej rozpuszczalności pochodnej **16**, czy też możliwe są inne czynniki? Pochodna **17** wykazała wyraźną aktywność fotocytotoksyczną wobec linii komórkowej ludzkiego raka prostaty (LNCaP), co ważne, przy braku istotnej aktywności cytotoksycznej w warunkach bez dostępu światła. Jej aktywność była wyraźnie wyższa w przypadku zastosowania formułacji liposomalnych, osiągając w warunkach normoksji IC₅₀ rzędu 160 nM. W warunkach hipoksji jej aktywność spadała, potwierdzając mechanizm działania obejmujący generowanie reaktywnych form tlenu. W dalszym ciągu jednak, aktywność utrzymywała się na poziomie blisko 400 nM, świadcząc o bardzo obiecujących właściwościach fotouczulających pochodnej **17**, zdolnej do zachowania istotnej aktywności cytotoksycznej, nawet w warunkach hipoksji, często występującej środowisku guza nowotworowego. Pochodne **15-17** zostały także poddane badaniom mikrobiologicznym, które wykonała sama doktorantka, pod kierunkiem prof. Jolanty Długoszewskiej z Katedry i Zakładu Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej UMP. Podobnie jak w przypadku aktywności przeciwnowotworowej, również aktywność przeciwbakteryjna okazała się najwyższa dla pochodnej **17**. Związek ten, w pozytywnie naładowanej formułacji liposomalnej, osiągnął logarytm redukcji 2,07 dla szczepu *S. aureus*. Aktywność związku w formułacji ujemnie naładowanej była wobec tego szczepu niższa, a wobec szczepu *E. Coli*, w przypadku obu formułacji bardzo niska. Świadczy to, o istotnej roli ładunku zastosowanych liposomów dla penetracji związku **17** do komórek bakteryjnych, co z kolei przekłada się na różnice w aktywności fotocytotoksycznej.

W ostatniej publikacji z cyklu, zatytułowanej „**Magnesium porphyrazine with peripheral methyl (3,5-dibromophenylmethyl)amino groups – synthesis and optical**

properties”, opublikowanej w Heterocyclic Communications w roku 2019, opisana została wieloetapowa synteza i szeroka charakterystyka fizykochemiczna aminowej pochodnej porfirazyny, stanowiącej porównanie dla otrzymanych i scharakteryzowanych wcześniej porfirazyn diazepinowych. Otrzymana z sukcesem rozbudowana pochodna porfirazyny, zawierająca peryferyjnie fragmenty dibromobenzytowe (oznaczona numerem **24**), została oceniona pod kątem zdolności do generowania tlenu singletowego, nie wykazując jednak pożądanej aktywności. Może to sugerować istotną, pozytywną rolę układu benzodiazepiny skondensowanego z układem porfirazyny, dla osiągnięcia aktywności fotosensybilizującej.

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska włącza się w bardzo istotny, z naukowego, medycznego i społecznego punktu widzenia, nurt badań poświęconych poszukiwaniu nowych terapii przeciwnowotworowych, i przeciwbakteryjnych. Stanowi ona także wartościowe rozwinięcie prac prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych UMP, będącym wiodącym ośrodkiem naukowym w tematyce opracowywania nowych fotosensybilizatorów. Tło naukowe rozprawy zostało przedstawione klarownie, w oparciu o liczne, adekwatne i aktualne cytowania. Cel pracy został sformułowany prawidłowo i jasno zaprezentowany, a użyta metodyka jest szeroka i właściwie dobrana. Uzyskane wyniki są oryginalne i przedstawione w sposób bardzo rzetelny, a dyskusja oparta na solidnych podstawach naukowych. Na uwagę zasługuje również szeroka współpraca, która przyczyniła się do znaczącego podniesienia jakości badań. Praca napisana jest bardzo dobrą polszczyzną, sposób wypowiedzi jest klarowny i precyzyjny, co znacznie ułatwia odbiór niełatwej tematyki rozprawy doktorskiej. Autorka posługuje się fachowym słownictwem, potwierdzając dobrą orientację w eksplorowanej dziedzinie nauki. Co również godne podkreślenia, strona edytorska pracy stoi na bardzo wysokim poziomie. Z obowiązku recenzenckiego, udało mi się znaleźć, pojedyncze błędy redakcyjne, które postanowiłem przekazać Autorce osobiście, i które w żadnym stopniu nie umniejszają wysokiej wartości naukowej ocenianej rozprawy.

Pracę uważam za w pełni odpowiadającą wymogom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk farmaceutycznych i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, o jej przyjęcie i dopuszczenie jej Autorki, Pani mgr Eweliny Wieczorek, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM
Zakład Chemii Leków
dr hab. Marek Kotarski, prof. UJ