



Politechnika
Śląska



UCZELNIA
BADAWCZA
INICJATYWA DOSKONAŁOŚCI

Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii

Dr hab. inż
Ilona Wandzik, prof. PS.

Gliwice, 19.01.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Adriana Domińskiego

pt. *pH-czułe systemy kontrolowanego uwalniania związków biologicznie aktywnych*

wykonanej w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze

pod kierunkiem profesora Piotra Kurcoka

opracowana na zlecenie Rady Naukowej CMPW PAN

Problem selektywnego dostarczania leków za pomocą nośników, które mogą uwalniać lek w sposób kontrolowany cieszy się dużym zainteresowaniem i jednocześnie stanowi duże wyzwanie, wymagające odpowiedniego przygotowania i znajomości zagadnienia. Współczesne badania próbują stawić czoła temu wyzwaniu, wykorzystując nanocząstki, jako nośniki leków. Wiele nanoleków weszło do praktyki klinicznej, a jeszcze więcej jest badanych w badaniach klinicznych pod kątem szerokiej gamy schorzeń. Obecnie większość nanoleków to wcześniej istniejące leki skoniugowane z nośnikiem w celu poprawy właściwości farmakokinetycznych i/lub farmakodynamicznych. Niektóre polimerowe nanocząstki mogą ułatwiać uwalnianie leku przez wiele tygodni bez gromadzenia się w organizmie. Dlatego polimerowe nanocząstki są uważane za obiecujące nośniki dla wielu leków, w tym leków przeciwnowotworowych. Biodegradowalne polimery są szczególnie interesujące, ponieważ mogą być w pełni metabolizowane i usuwane z organizmu. W tym nurcie mieści się przedstawiona do recenzji praca; tematyka badań podjętych w rozprawie jest bardzo aktualna i istotna z naukowego punktu widzenia. Biorąc pod uwagę bogate doświadczenie w zakresie biodegradowalnych materiałów polimerowych promotora pracy, profesora Piotra Kurcoka, doktorant trafił na bardzo dobry grunt, gdzie mógł rozwijać swoje badania.

W ogólnym zarysie badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej miały na celu opracowanie biodegradowalnych, pH-czułych nośników substancji biologicznie aktywnych.

Doktorant przeprowadził syntezę trzech rodzajów nośników, dwa typy miceli oraz supramolekularne hydrożele, które zawierały odpowiednie ugrupowania ulegające hydrolizie w lekko kwaśnym środowisku

Politechnika Śląska

Wydział Chemiczny

Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii

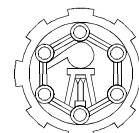
ul. Krzywoustego 8, pok. 013, 44-100 Gliwice

+48 32 237 20 28

ilona.wandzik@polsl.pl

NIP 631 020 07 36

ING Bank Śląski S.A. o/Gliwice 60 1050 1230 1000 0002 0211 3056



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



komórek nowotworowych. Do takich układów pułapkowane były związki biologicznie aktywne: lek przeciwnowotworowy (doksorubicyna) oraz 8-hydroksychinolina i jej glikozylowane pochodne.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma charakter tradycyjny i zawiera następujące rozdziały: wprowadzenie, część literaturową, cel i zakres pracy, omówienie wyników badań, wnioski końcowe, część doświadczalną, spis literatury, dorobek naukowy Autora i streszczenie. Przedłożona praca zawiera 174 strony, 75 rysunków, 12 tabel, 315 odnośników literaturowych. Najobszerniejszą częścią rozprawy jest omówienie wyników (ponad 60 stron).

Rozprawa jest napisana bardzo starannie, komunikatywnym językiem i zawiera bardzo dobrze opracowane rysunki. Wszystko to sprawia, że czyta się ją z dużym zainteresowaniem. Byłam pod dużym wrażeniem części literaturowej pracy, gdzie Autor w sposób bardzo interesujący wprowadza czytelnika w tematykę dotyczącą wykorzystania różnych polimerowych nośników leków w terapii przeciwnowotworowej. W pracy nie znalazłam poważnych błędów merytorycznych ani metodycznych, niemniej jednak chciałam przedstawić kilka uwag w kolejności takiej jak zostało opisane w przedłożonej rozprawie.

Część literaturowa składa się z kilku podrozdziałów. W pierwszych trzech rozdziałach (2.1-2.3) Autor przedstawia polimerowe systemy kontrolowanego uwalniania leków, ze szczególnym uwzględnieniem biernego i aktywnego dostarczania leków. Dobrze dobrane zagadnienia przedstawione na 12 stronach poparte są aż 104 pozycjami literaturowymi (czy Autor miał czas, aby się z nimi wszystkimi zapoznać?). Przedstawione są przykładowe formułacje dopuszczone na rynek i takie, które są w trakcie badań klinicznych. I tak, opisując preparat BIND-014 zaprojektowany do aktywnego celowania Autor wspomina na stronie 15, że jest on w drugiej fazie badań klinicznych i że wyniki są obiecujące. Jednakże informacja ta zaczerpnięta z ref. [77] z 2012 roku powinna zostać zaktualizowana (ostatecznie tego preparatu nie wprowadzono na rynek). Podobnie podając liczby zatwierdzonych leków, bądź leków w trakcie badań klinicznych (strony 16, 22 i 24) należało podać datę tych informacji. Podobnie w rozdziale 4.2.2, strona 71 – informacja dotycząca NC-6300 i INNO-206.

W kolejnym rozdziale 2.4 opisane zostały polimerowe nanocząstki reagujące na bodźce, jako nośniki leków w terapii przeciwnowotworowej. Szczególnie istotny jest podrozdział 2.4.1, w którym Autor opisuje różne podejścia w projektowaniu pH-czułych nośników leków i popiera je odpowiednimi przykładami. W ostatnich dwóch rozdziałach części literaturowej 2.5 i 2.6 opisane są supramolekularne hydrożele typu gość-gospodarz na bazie cyklodekstryn do miejscowego podawania leków oraz biodegradowalne poliestry i poliwęglany, jako biodegradowalne nośniki. Cała część literaturowa bardzo dobrze koresponduje z badaniami własnymi opisanymi w dalszej części dysertacji.



Omówienie wyników badań poprzedzone jest jasno sprecyzowanymi celami i krótkim wprowadzeniem, które ułatwia czytelnikowi zorientowanie się w wielowątkowej pracy.

Prosiłabym Autora o komentarz do zdania na stronie 60/61: „Należy podkreślić, iż w pracy zaprezentowano nowy kierunek badań, w którym zaproponowano enkapsulację substancji biologicznie aktywnych, tj. glikokoniugatów 8-hydroksychinoliny do pH-czułego nośnika, w celu zwiększenia selektywności terapii przeciwnowotworowej, mając na uwadze, że oba wektory (pH-czułość nośnika oraz glikokoniugacja) celują w specyficzny dla komórek nowotworowych efekt Warburga.” Proszę o wyjaśnienie czy glikokoniugaty 8-hydroksychinoliny można traktować jako leki stosowane w terapii przeciwnowotworowej? Jaka jest interpretacja dotycząca glikokoniugatu jako wektora? Co oznacza celowanie w specyficzny dla komórek nowotworowych efekt Warburga?

W pierwszej części omówienia wyników Doktorant przedstawił syntezę amfifilowego diblokowego kopolimeru zawierającego jednostkę PEG połączoną poprzez ugrupowanie hydrazonowe. Taki kopolimer był zdolny do samoorganizacji w micela i zgodnie z hipotezą Autora hydroliza wiązania hydrazonowego w środowisku kwaśnym (pH 6,4 i 5,5) powodowała możliwość zrzucania zewnętrznej warstwy PEGu, w efekcie czego micela reorganizują się w większe struktury. Zastosowanie strategii wykorzystującej zrzucanie warstwy PEGu jest bardzo ciekawym podejściem. Dzięki niemu w tkankach nowotworowych charakteryzujących się obniżonym pH, krążące nanocząstki pozbawione hydrofilowej otoczki mogą być łatwiej wychwytywane przez komórki, co zostało opisane przez Autora w części literaturowej, jako „dylemat PEGu”. W kolejnym rozdziale 4.2.4 zostały opisane badania stabilności miceli mPEG-hyd-aPHB z wykorzystaniem techniki DLS. Micela były inkubowane w 37°C w buforach fosforanowych o różnym pH (7,4, 6,4 i 5,5). Przy fizjologicznym pH (7,4) micela mPEG-hyd-aPHB były stabilne do 24 godzin, a po tym czasie zaczęły tworzyć większe agregaty. Autor tłumaczy ten fakt powolną hydrolizą wiązania hydrazonowego w lekko zasadowym pH, któremu towarzyszy reorganizacja miceli (strona 78/79). Może warto oprócz środowiska buforu fosforanowego sprawdzić stabilność miceli w środowisku zawierającym medium hodowlane z surowicą lub bez. W obecności białek stabilność miceli może być inna.

Następnie zaprezentowane zostały badania enkapsulacji i uwalniania leków *in vitro*. Procedury są dokładnie opisane w części eksperymentalnej (rozdział 6.8). Moje wątpliwości budzi fakt odwirowania niespółapkoowanej doksorubicyny z roztworu wodnego w celu oznaczenia efektywności spulapkowania leku (DLE). Jeśli niezwiązana doksorubicyna wypada z roztworu wodnego to znaczy, że również będzie wypadała z roztworu podczas badania uwalniania leku. Tym razem będzie to miało miejsce w kapsule do dializy i to może zafałszować wyniki. W jakiej formie dializowana była wolna doksorubicyna przedstawiona na wykresie (Rys. 40) ? W kolejnym rozdziale opisane są badania biologiczne z udziałem miceli



zawierających hydrazonowe ugrupowanie (mPEG-hyd-aPHB) ze związkami aktywnymi i bez. Wykonano zaawansowane badania *in vitro*, z których wynika, że micelle są nietoksyczne wobec komórek nowotworowych i prawidłowych. Micelle ze sputakowanymi związkami aktywnymi skutecznie hamowały proliferację komórek nowotworowych i charakteryzowały się wyższymi współczynnikami selektywności w porównaniu do wolnych związków aktywnych. Ciekawi mnie, na ile odmiennie zachowywałyby się micelle bez ugrupowania hydrazonowego ze sputakowanymi związkami aktywnymi? Takie badania dodatkowo potwierdziłyby założenia dotyczące wpływu hydrolizy fragmentu PEGowego na aktywność biologiczną. Na stronie 90 (tekst pod Rys. 46) Autor wyciąga wniosek o biokompatybilności: „Analizując powyższe wyniki można zaobserwować, że wszystkie testowane linie komórkowe inkubowane z pustymi micelami, nie wykazują cech apoptozy, potwierdzając tym samym biokompatybilność nośnika”. Mój komentarz jest taki, że wykonane badania *in vitro* nie pozwalają na wyciągnięcie wniosku na temat biokompatybilności. Biokompatybilność lub biogodność to ogólny termin opisujący właściwość materiału, który jest kompatybilny z żywą tkanką. Materiały biokompatybilne nie wywołują reakcji toksycznej ani immunologicznej w kontakcie z ciałem lub płynami ustrojowymi. Materiały takie oprócz braku toksyczności powinny charakteryzować się brakiem wpływu na układ odpornościowy organizmu, nie powinny powodować hemolizy, itd., a takich wniosków nie można wyciągnąć z przeprowadzonych badań biologicznych.

Druga seria pH-czułych nośników to zdolne do samoorganizacji w roztworach wodnych amfifilowe kopolimery blokowe: poli(etero-b-węglan) i poli(etero-b-węglan-b-ester) zawierające w bloku węglanowym ulegające szybkiej hydrolizie w środowisku kwaśnym ugrupowanie ketalowe. W wyniku hydrolizy ketalu tworzyły się dwie grupy hydroksylowe, które osłabiały oddziaływania hydrofobowe w rdzeniu miceli, w efekcie czego micelle pęczniały, uwalniając enkapsulowaną substancję aktywną. Dobrym pomysłem było wprowadzenie do polimeru silnie hydrofobowego bloku niskocząsteczkowego poli([R]-3-hydroksymaślanu), co zapewniło większą stabilność i znaczne obniżenie wartości CMC.

Ostatnia, trzecia seria pH-czułych polimerów to supramolekularne hydrożele oparte na interakcjach gość-gospodarz pomiędzy α -cyklodekstryną i łańcuchami PEG, które mogą znaleźć zastosowanie jako wstrzykiwalne systemy dostarczania leków. Tym razem pH-czułość powodowana była ugrupowaniami ketalowymi w łańcuchach podchodzących od pH-czułych micel z kopolii(etero-b-węglanu). Takie układy zastosowano do współdostarczania dwóch związków: hydrofobowej doksorubicyny oraz pochodnej 8-hydroksychinoliny połączonej poprzez linker triazolowy z 6-deoksy-D-glukopiranozą jako związku hydrofilowego. Metodami dyfrakcji promieni rentgenowskich i różnicowej kalorymetrii skaningowej potwierdzono tworzenie się poli(pseudo)rotaksanów i krystalicznych kompleksów typu kanałowego stanowiących obok rdzeni micel dodatkowe węzły sieci w otrzymanym supramolekularnym hydrożelu.



Takie układy charakteryzowały się niespotykaniem dla porowatych hydrożeli długim czasem uwalniania związków aktywnych o charakterze „małych cząsteczek”.

Mam uwagę do wniosku przedstawionego na stronie 126: „8HQ-Glu może łatwo przenikać do komórek rakowych poprzez aktywny transport przez transportery GLUT, natomiast micelle są endocytowane przez komórki, co przedłuża w czasie jego aktywność cytotoksyczną”. Zgadzam się z argumentacją Autora, że micelle mogą przedostawać się do komórki w wyniku endocytozy. Natomiast nie podzielam opinii o możliwości przenikania hydrofilowej 8HQ-Glu poprzez transportery GLUT. Aktualnie jest znana struktura 3D transporterów GLUT (Deng i współpracownicy, Nature 2014, 510, 121-125 oraz Nature 2015, 526, 391-396) i wydaje się mało prawdopodobne, aby hydrofilowa 8HQ-Glu mogła wnikać do komórki poprzez transportery GLUT, co najwyżej mogłaby oddziaływać z transporterem w konformacji zewnętrznie otwartej (outward open) i w ten sposób antagonizować transporter.

Ostatnią częścią rozprawy jest część doświadczalna, w której Doktorant wyszczególnia stosowane odczynniki, dokładnie opisuje wszystkie przeprowadzone syntezy oraz metody stosowane do charakterystyki fizykochemicznej otrzymanych połączeń. Opisane są również procedury badań biologicznych, które zostały przeprowadzone we współpracy z Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej. Wyniki badań zostały bardzo starannie opracowane i zestawione w tabelach.

Kilka dodatkowych uwag przedstawiam poniżej:

- brak informacji o uzyskaniu praw do reprodukcji rysunków przedstawionych w części literaturowej
- brak odwołania w tekście do niektórych rysunków, np. rys. 8, 11, 16, 17, 18
- brak konsekwencji w stosowaniu niektórych skrótów, np. 8HQ (często używana była cała nazwa: 8-hydroksychinolina), ponadto „hydrofilowy glikokoniugat 8HQ-Glu” powinien mieć dla odróżnienia inny skrót; przyjęto jedno oznaczenie 8HQ-Glu zarówno dla pochodnej 6-deoksy-D-glukopiranozy jak i acetylowanego glukozydu
- pK_a – parametr ten powinien mieć literę **a** w indeksie dolnym
- str. 34, Rys. 12a – na rysunku przedstawione jest ugrupowanie iminowe, a nie hydrazonowe
- str. 48, Rys. 19 – „Struktura molekularna cząsteczki cyklodekstryny....” – czy nie wystarczy struktura cyklodekstryny?
- str. 53 – zbyt długie, niepoprawne zdanie: „Kontrola mikrostruktury pozwala na projektowanie właściwościach fizykochemicznych syntezowanego PHB (np. ataktyczny poli([R,S]-3-hydroksymaślan) jest polimerem amorficznym [264]), co otwiera wiele możliwości podczas



projektowania biodegradowalnych i bioresorbowalnych nośników leków na bazie poli(3-hydroksymaślanu) [262, 265]”

- str. 64 – „Zasadowość użytych inicjatorów, oparta na pK_a w DMSO, została przyjęta z tablic Brodwelli [292] i była następująca (wartości pK_a w DMSO poszczególnych fenolanów w nawiasach): p-NO₂PhONa (10.8) < p-CIPhONa (16.7) < NaphONa (17.2) < PhONa (18) < p-CH₃OPhONa (19.1)” – w nawiasach przedstawiono wartości pK_a dla fenoli, czyli związków o charakterze kwasów; Autor miał na myśli zasadowość, czyli powinny zostać przedstawione wartości pK_b dla anionów fenolanowych.
- str. 86, Rys. 44 i Rys. 45 – oba rysunki przedstawiają cytotoksyczność wolnej i enkapsulowanej 8HQ

Przedstawione w recenzji uwagi polemiczne i pytania o charakterze dyskusyjnym nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny recenzowanej rozprawy. Cel pracy został zrealizowany pomyślnie. Autor wykazał się niewątpliwie dobrym przygotowaniem merytorycznym, dużą starannością w planowaniu i prowadzeniu eksperymentów. Przyjęta metodyka jest poprawna. Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej są wartościowe, posiadają elementy nowości naukowej i zostały już opublikowane w sześciu publikacjach naukowych z listy JCR (dwie z nich to publikacje przeglądowe) oraz były zaprezentowane na czternastu konferencjach o zakresie krajowym i międzynarodowym. Warto nadmienić, że badania prowadzone w niniejszej pracy były współfinansowane z kilku projektów, ponadto Doktorant odbył dwa miesięczne staże zagraniczne.

Uważam, że rozprawa doktorska pt. ***pH-czułe systemy kontrolowanego uwalniania związków biologicznie aktywnych*** spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2020 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2020 r. poz. 85) i z pełnym przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie **mgr inż. Adriana Domińskiego** do dalszych etapów postępowania.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy recenzowanej pracy, jej interdyscyplinarność i szeroki zakres obejmujący syntezę i charakterystykę trzech serii nośników, zastosowanie nośników do pułapkowania związków aktywnych oraz badania biologiczne z ich udziałem, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Adriana Domińskiego. Wymiernym potwierdzeniem wartości pracy są opublikowane już prace związane bezpośrednio z tematyką rozprawy.

Ilona Wandzik

Dr hab. inż. Ilona Wandzik, prof. PŚ.