

Prof. dr hab. Ewa Sawosz Chwalibóg
Katedra Nanobiotechnologii
Instytut Biologii
SGGW w Warszawie

Ocena rozprawy doktorskiej

Pana mgr Krzysztofa Szandery

„Nanonośniki rózu bengalskiego w terapii fotodynamicznej raka podstawnokomórkowego skóry”

przygotowanej pod kierunkiem

Pani prof. dr hab. Barbary Klajnert-Maculewicz

Informacje ogólne o pracy

- Recenzja, przedstawionej mi do oceny pracy, została przygotowana na podstawie pisma Pani prof. dr hab. Agnieszki Marczak – Przewodniczącej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne

Formalna ocena

Rozprawa doktorska stanowi zwarte opracowanie, przygotowane w języku polskim, liczące 17 stron, zawierające „Omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników”, polskie i angielskie streszczenie, „Dorobek naukowy” oraz „Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej” oraz Oświadczenia współautorów publikacji dokumentujące udział Kandydata w publikacjach. Można stwierdzić, że praca doktorska, pod względem formalnym, jest przygotowana zgodnie z obowiązującymi zasadami, zawiera wszystkie elementy pozwalające na przygotowanie jej oceny. Praca składa się z 5 publikacji, we wszystkich Kandydat jest pierwszym autorem. Oświadczenia współautorów potwierdzają decydujący i istotny merytorycznie udział Pana Krzysztofa Szandery w przygotowaniu publikacji.

Merytoryczna ocena

Praca stanowi cykl publikacji:

1. Szandera K., Gorzkiewicz M., Klajnert-Maculewicz B. (2020). Nanocarriers in photodynamic therapy- in vitro and in vivo studies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12(3), e1509. IF₅ – 9,599; 25 cyt.; 140 pkt.
2. Szandera K., Marcinkowska M., Gorzkiewicz M., Janaszewska A., Laurent R., Zabłocka M., Mignani S., Majoral J.P., Klajnert-Maculewicz B. (2020). In search of a phosphorus dendrimer-based carrier of rose bengal: tyramine linker limits fluorescent and phototoxic properties of a photosensitizer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4456. IF₅ – 6,628; 6 cyt.; 140 pkt)
3. Szandera K., Gorzkiewicz M., Dias Martins A.S., Pallante L., Zizzi E.A., Miceli M., Bątał M., Pinto Reis C., Deriu M.A., Klajnert-Maculewicz B. (2021). Noncovalent

interactions with PAMAM and PPI dendrimers promote the cellular uptake and photodynamic activity of rose bengal: the role of the dendrimer structure. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(21), 15758- 15771. IF₅ – 7,897; 4 cyt.; 200 pkt.

4. Sztandera K., Gorzkiewicz M., Bątał M., Arkhipova V., Knauer N., Sanchez-Nieves J., de la Mata F.J., Gomez R., Apartsin E., Klajnert-Maculewicz, B. (2022). Triazine-carbosilane dendrimersomes enhance cellular uptake and phototoxic activity of rose bengal in basal cell skin carcinoma cells. *International Journal of Nanomedicine*, 17, 1139-1154. IF₅ – 7,419; 1 cyt.; 140 pkt.
5. Sztandera K., Gorzkiewicz M., Wang X., Appelhans D., Klajnert-Maculewicz B. (2022). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. pH-stable polymersome as nanocarrier for post-loaded rose bengal in photodynamic therapy, 217, 112662. IF₅ – 5,596; 100 pkt.

Łączny IF prac wynosi 37,139, liczba punktów MNiSW 720 pkt., a suma liczby cytowań prac to 36 (wg Web of Science cc. 25.08.2022).

Praca, złożona z 5 publikacji, jest poprzedzona krótkim i skoncentrowanym omówieniem. We wprowadzeniu Kandydat uzasadnia przyczynę, dla której podjął przeprowadzone badania na tle poziomu i zaawansowania terapii przeciwko nowotworom skóry, w tym podstawnokomórkowego nowotworu skóry. Wydaje się, że zwłaszcza ocieplenie klimatu i zwiększona ekspozycja na promieniowanie UV, w obecnym czasie, może sprzyjać zwiększonej zachorowalności na nowotwory skóry, co dodatkowo zwiększa potrzebę poszukiwania nowych metod terapii. Kandydat proponuje w swej pracy zastosowanie terapii celowanej, a dokładnie fototerapii celowanej. Pan mgr Krzysztof Sztandera zaproponował róż bengalski jako bezpieczny fotouczulacz. Ten interesujący światłoczuły barwnik, stosowany jest również jako marker w mikroskopii, do identyfikacji uszkodzeń rogówki, czynnik antibakteryjny oraz składnik leków do leczenia chorób skóry i niektórych nowotworów. Leki, oparte na różu bengalskim (PV-10) przeznaczone do leczenia czerniaka, raka piersi oraz łuszczyca są w fazie badań klinicznych. Jednak podstawową wadą różu bengalskiego, jak podkreślił Autor, jest krótki okres półtrwania w organizmie, tendencje do agregowania, oraz ujemny ładunek co utrudnia zastosowanie barwnika w terapii. Kluczową trudnością, która ogranicza wykorzystanie różu bengalskiego w fototerapii jest ograniczona zdolność do wnikania do komórki wynikająca z jego cech fizycznych, zatem koncepcja Autora polegająca na zastosowaniu nanonośnika, który pozwalałby na skuteczny i bezpieczny transport do komórki jest interesująca i nowatorska, co więcej badania te mogłyby fundamentalnie udoskonalić terapię z zastosowaniem fotouczulacza. Ponadto, mała toksyczność dla organizmu człowieka i duża fotoaktywność, powodują, że róż bengalski ma duży potencjał terapeutyczny. Wybór tego związku do badań uważam za bardzo interesujący i obiecujący. Kandydat zaproponował więc stworzenie kompleksów, które zawierałyby róż bengalski skoniugowany z wybranymi nanostrukturami, a mianowicie dendrymerami poliamidoaminowymi i polipropylenoiminowymi, dendrymerami fosforowymi, polimersomami i dendrymersomami. Postawiona w pracy hipoteza zakładała, że zaproponowane „nanoukłady zwiększą efektywność transportu dokomórkowego, co w

konsekwencji zwiększy aktywność fotodynamiczną różu bengalskiego”. Kandydat przedstawił więc jasną hipotezę, która określiła cel pracy.

W dalszej części „Omówienia” Kandydat przedstawił metodykę badań. Badania przeprowadzono na czterech rodzajach nanoukładów, zawierających róż bengalski oraz wybrane rodzaje dendrymerów, połączone wiązaniami niekowalencyjnymi lub kowalencyjnymi oraz polimersomami i dendrymersomami. Na uwagę zasługuje dobór linii komórkowych raka podstawnokomórkowego. Mysie Linie komórkowe były zróżnicowane pod względem genotypu (gen p53) oraz sposobu indukcji guza (promieniowanie UV i promieniowanie jonizujące), zatem stworzono taki model doświadczenia, który w ramach tego samego rodzaju nowotworu mógł dać szerszą odpowiedź obejmującą różne jego formy. To pozwala na większe uogólnienie sukcesu proponowanej terapii onkologicznej. Syntetyczne przedstawienie zastosowanych metod badawczych pozwala na ich ogólną ocenę i ocenę trafności doboru. Szczegóły zastosowanych metod są przedstawione w publikacjach. Kolejna część „Omówienia” dotyczy wyników, uzyskanych podczas zrealizowanych badań. Autor przedstawił kwintesencję podjętych badań i rozwiązanych problemów naukowych, które tworzą bardzo logiczną, przyczynowo-skutkową historię. Kolejne problemy badawcze są logicznie powiązane i przedstawione w bardzo jasny, uporządkowany i syntetyczny sposób. Z punktu widzenia recenzenta w części wyniki zabrakło mi jedynie przytoczenia nazwy linii komórkowej, którą zastosowano do badań.

Na zakończenie Autor podsumował uzyskane wyniki, formułując obserwacje i wnioski. Zazwyczaj podsumowanie przeprowadzonych eksperymentów, gdzie uzyskano wiele interesujących wyników nie jest prostym zadaniem, jednak w tym przypadku wydaje się, że przeprowadzono to w optymalny sposób. W części pierwszej opisano najważniejsze zależności, które zostały zaobserwowane, natomiast w części drugiej zaprezentowano dojrzałe uogólnione wnioski. Moja drobna uwaga dotyczy jednak (podobnie jak w przypadku Wyników) przytoczenia nazwy linii komórkowej, zastosowanej w badaniach, w sformułowanych obserwacjach. Przeprowadzone eksperymenty odnoszą się do danej linii komórkowej, można jedynie przypuszczać, że aktywność badanych nanoukładów wobec innych linii komórkowych może być zbliżona.

Praca doktorska, przedłożona przez Pana Krzysztofa Sztanderę stanowi komplet publikacji. Pierwszą z nich jest obszerna praca przeglądowa, która jest doskonałym wstępem do kolejnych prac eksperymentalnych. Praca ta wskazuje na kierunki i zagadnienia, które nie są zbadane, a które mogą przyczynić się do zwiększenia efektywności leczenia nowotworów skóry. Autorzy zwracają uwagę na stosunkowo małą liczbę badań nad terapią fotodynamiczną i wynikającą z tego małą liczbą nanonokompleksów, które dotarły do etapu badań in vivo. Autorzy zwrócili uwagę na kluczowe sprawy jak biogodność nanokompleksów rekomendowanych do terapii fotodynamicznej oraz powtarzalność syntezy proponowanych kompleksów. Niewątpliwie, publikacja ta jest interesującym i potrzebnym zaproszeniem do części eksperymentalnej i wskazuje, że podjęte badania są niezwykle potrzebne.

W publikacji drugiej Autorzy zbadali możliwości stworzenia stabilnego kompleksu różu bengalskiego i dendrymerów fosforanowych generacji 1,2 i 3 z zastosowaniem łącznika –

tyraminy. Badanie te wykazały jednak, że chociaż stworzony został doskonale stabilny nanonośnik nie był on skuteczna jako fotouczulacz. Wyniki te zainspirowały poszukiwania innego rozwiązania jakim stały się nanonośniki, które mogłyby łączyć się z różem bengalskim w sposób niekowalencyjny.

Publikacja trzecia jest, moim zdaniem, najbardziej interesująca. Na uwagę zasługuje wnikliwa charakterystyka oddziaływań pomiędzy różem bengalskim a dendrymerami PAMAM i PPI trzeciej i czwartej generacji. Wykazano, że zależne od generacji i struktury wiązanie barwnika przez dendrymery zwiększa skuteczność transportu barwnika do komórki i w konsekwencji produkcję tlenu singletowego i reaktywnych form tlenu. Koncepcja i molekularne wyjaśnienie zwiększenia fototoksyczności różu bengalskiego poprzez wiązanie go z zastosowanymi nanonośnikami jest dużym osiągnięciem naukowym, sukcesem o charakterze międzynarodowym.

W publikacji czwartej Autorzy zaproponowali stworzenie konstruktów sformowanych z różu bengalskiego zamkniętego w amfifilowych dendronach triazyno-karbosilanowych, jako system dostarczania barwnika do komórki. Na podkreślenie zasługują zastosowane procedury i techniki analityczne, które umożliwiły syntezę dendronów o projektowanych cechach i potwierdzenie ich właściwościach. W wyniku badań Autorzy wykazali, że róż bengalski, zamknięty w dendrymersomach jest skutecznie transportowany do komórki, co zwiększa fototoksyczność tego fotouczulacza. Wynik ten jest znaczącym osiągnięciem naukowym Zespołu.

Publikacja piąta prezentuje nowatorski nanosystem, zbudowany z polimersomu i różu bengalskiego. Przedstawiono precyzyjną charakterystykę powstawania, właściwości fizycznych i aktywności biologicznej tego układu. Optymalizacja tego nanosystemu w zakresie połączenia z różem bengalskim, jego przechowywaniem i uwalnianiem jest zdecydowanie dużym sukcesem Zespołu, w tym Autora.

Podsumowując ocenę dysertacji doktorskiej przygotowanej przez Pana mgr Krzysztofa Sztanderę można stwierdzić, że przeprowadzone badania są nowatorskie, doskonale opracowane, opublikowane w bardzo dobrych czasopismach. Zastosowane w doświadczeniach metody badawcze i analityczne są dobrze opisane i nie budzą zastrzeżeń, co więcej umożliwiły szeroką i precyzyjną charakterystykę wykreowanych przez Autora nanosystemów. Ten bardzo istotny element pozwoli w przyszłości na opracowanie powtarzalnej procedury syntezy tych potencjalnych leków – fotouczulaczy. Badania, niewątpliwie wnoszą nowe wartości, wyjaśniają nieznanne mechanizmy i są podstawą do dalszych badań in vivo zmierzających do opracowania nowej metody terapii fotodynamicznej w leczeniu nowotworów skóry. Prace zostały opublikowane w czasopismach bardzo dobrych o IF > 5, co jest dowodem ich wysokiego poziomu merytorycznego. Publikacje są kompatybilne i spójne tematycznie, tworzą pewien ciąg przyczynowo-skutkowy, który rozwiązuje postawiony w hipotezie problem na poziomie badań in vitro. Zbiór publikacji jest opatrzony syntetycznym, jasnym i logicznym „Omówieniem”. Te interesujące badania nasuwają również pytania dotyczące przypuszczalnego mechanizmu transportu syntetyzowanych nanokompleksów do komórki. Co więcej, komórki nowotworowe wykazują bardzo odmienny

behawior, w tym metabolizm, w porównaniu do komórek nie nowotworowych, jak zdaniem Kandydata, może przebiegać interakcja badanych nanosystemów z komórkami nie nowotworowymi.

Podsumowanie recenzji

Tematyka, jaką podjął Pan mgr Krzysztof Sztandera w pracy doktorskiej „Nanonośniki różu bengalskiego w terapii fotodynamicznej raka podstawnocomórkowego skóry”, przygotowanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Barbary Klajnert-Maculewicz została przygotowana na wysokim poziomie merytorycznym, proponuje nowatorskie rozwiązanie w zakresie zwiększenia precyzji i skuteczności terapii fotodynamicznej w leczeniu nowotworów skóry. Wyniki badań, bez wątplenia, będą miały wpływ na rozwój dyscypliny i postęp w zakresie terapii onkologicznej. W konkluzji recenzji stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Krzysztofa Sztandery „Nanonośniki różu bengalskiego w terapii fotodynamicznej raka podstawnocomórkowego skóry”, przygotowanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Barbary Klajnert-Maculewicz odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Niniejszym, przedstawiam Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne wnioski o dopuszczenie mgr Krzysztofa Sztanderę do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Ponadto, wnoszę również o wyróżnienie pracy doktorskiej Krzysztofa Sztandery „Nanonośniki różu bengalskiego w terapii fotodynamicznej raka podstawnocomórkowego skóry”, z uwagi na duży potencjał nowatorski badań, a także rozwiązanie postawionych w celu badań problemów z uwzględnieniem wyjaśnienia mechanizmów fizyko-chemicznych i biologicznych oraz zastosowanie zaawansowanych i precyzyjnych metod do rozwiązania weryfikacji postawionych hipotez badawczych.

Ewa Sawosz Chwalibóg, 7.09.2022

