

Łódź, dn. 4.05.2023 r.

Prof. dr hab. inż. Grażyna Budryn
Instytut Technologii i Analizy Żywności
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

Recenzja pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Malinowskiej
wykonanej w Zakładzie Chemii Biofizycznej w Katedrze Chemii Fizycznej
na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego,
której Promotorem jest prof. dr hab. Bartłomiej Pałecz,
a Promotorem pomocniczym dr Adam Buczkowski,
pt: „Badania oddziaływań dendrymeru PPI G4 z wybranymi lekami i aminokwasami
w środowisku wodnym”

Recenzja wykonana na podstawie Uchwały Komisji Uniwersytetu Łódzkiego
do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki chemiczne z dn. 22 lutego 2023 r.

Wartość merytoryczna rozprawy

W przeglądzie literatury, który stanowi wraz ze Wstępem blisko jedną trzecią dysertacji, Doktorantka skupiła się na charakterystyce makrocząsteczek w formie dendrymerów, metodach ich otrzymywania i zastosowaniach, głównie biologicznych, wynikających w ich specyficznych właściwości. Pani mgr Malinowska opisała także siedem substancji, które w pracy doktorskiej kompleksowała z dendrymerami. W tej części rozprawy Doktorantka zacytowała aż 197 pozycji literaturowych, z czego blisko połowa to publikacje z ostatnich 10 lat; co wskazuje na przedstawienie bardzo aktualnych zagadnień odnoszących się do stanu wiedzy na temat dendrymerów i ich wykorzystania. Najistotniejsze zagadnienia wynikające z opracowanej przez Doktorantkę krytycznej analizy literatury przedmiotu wskazują, że obecność wnęki hydrofobowej w dendrymerach może być wykorzystana do uwięzienia substancji bioaktywnych, dając możliwości późniejszego kontrolowanego i stabilnego ich uwalniania.

Jeden z rodzajów tych makrocząsteczek, dendrymery polipropylenoiminowe (PPI) są relatywnie proste w syntezie i stabilne termicznie, a dzięki łatwości kompleksowania z szeregiem leków mogą stanowić interesujący obiekt badań o potencjale aplikacyjnym w farmacji. Szczególnie interesujące może być wykorzystanie kompleksów z tym rodzajem dendrymerów do zwiększania rozpuszczalności leków, a przez to zwiększania także ich dostępności. Jedną z cech dendrymerów jest ich kulisty kształt, monodispersja i modyfikowalna funkcjonalność powierzchni oraz zdolność do łatwego przenikania przez błony komórkowe ze względu na ich nanorozmiar i lipofilowość, co czyni je idealnymi kandydatami do otrzymywania nośników leków. Kompleksowanie z PPI może zwiększyć potencjał terapeutyczny leków nie tylko poprzez wzrost rozpuszczalności, ale także zmniejszenie ich degradacji przed dostarczeniem do tkanek. W przypadku antybiotyków, które są przyswajalne i metabolizowane tylko w pewnej części dawki wprowadzonej do organizmu, a niewchłonięta i niezmodyfikowana pozostałość trafia do środowiska, zwiększenie wchłaniałości wydaje się bardzo obiecującą strategią ograniczania antybiotykooporności patogenów.

Koniugaty dendrymer-lek mogą zmniejszyć efekty ogólnoustrojowe i zwiększyć skuteczność w docelowym miejscu w porównaniu z wprowadzaniem w postaci wolnej. Okres półtrwania leków można zwiększyć przez sprzężenie z dendrymerami nawet 50-krotnie, co może zwiększyć skuteczność leku i zmniejszyć częstotliwość jego podawania. Rozpuszczalność leków w wodzie zwiększa się

w połączeniu z dendrymerami nawet kilka tysięcy razy. Opracowywanie nośników farmaceutyków jest mniej czasochłonne i bardziej opłacalne niż opracowywanie nowych leków.

Pierwsze doniesienia o dendrymerach pojawiły się w latach 70-tych ubiegłego wieku. Od końca lat 80-tych możemy mówić o akceleracji badań z wykorzystaniem dendrymerów, która trwa do dziś.

W ostatnich latach rocznie pojawia się około 1000 publikacji dotyczących tego zagadnienia. Nie pozostawia to wątpliwości, że badanie zdolności kompleksowania różnych związków bioaktywnych z dendrymerami jest zagadnieniem bardzo aktualnym i uzasadnionym. Na podstawie przeglądu literatury mgr Malinowska sformułowała cel pracy doktorskiej, którym była analiza termodynamiczna oddziaływań dendrymeru PPI czwartej generacji (G4) z wybranymi ligandami o znaczeniu biochemicznym. Doktorantka nie przedstawiła hipotez badawczych związanych z wyznaczonym celem badań.

Praca obejmuje od strony metodycznej utworzenie kompleksów dendrymerów PPI G4 z pięcioma lekami dedykowanymi terapii nowotworowej oraz z dwoma aminokwasami, które także wykazują znaczenie terapeutyczne. Większość prac dotyczących kompleksowania leków z dendrymerami dotyczy badań mechanizmów powstawania kompleksów, zmiany właściwości ligandów na skutek przyłączania do makrocząsteczki, takich jak zwiększenie rozpuszczalności, biodostępności, okresu półtrwania, stabilności ligandów podczas przechowywania i trawienia oraz pochłonięciu, czy zmniejszenia toksyczności leków. Autorka w pracy doktorskiej skupiła się na pomiarach rozpuszczalności metodą spektrofotometryczną, wyznaczeniu liczby miejsc aktywnych dendrymeru, stechiometrii interakcji i stałej wiązania z ligandami metodą dializy równowagowej i izotermicznej kalorymetrii miareczkowej, a wykorzystując tę drugą metodę wyznaczyła także inne parametry termodynamiczne interakcji, natomiast metodą ^1H NMR Doktorantka wskazała ugrupowania PPI G4 odpowiedzialne za przyłączenie ligandu.

Wartość naukowa rozprawy

W części doświadczalnej mgr Malinowska omówiła szczegółowo podstawy teoretyczne technik, które wykorzystwała w pracy do badań kompleksów dendrymerów PPI G4 z wybranymi przez siebie lekami. Badanie spektrofotometryczne wykazało tworzenie kompleksów z badanymi substancjami, tj. 5-fluorouracyłem, 5-jodouracyłem, tegafurem, azytotymidyną oraz tryptofanem i tyrozyną oraz liczbę miejsc aktywnych i wzrost ich rozpuszczalności, natomiast w odniesieniu do monofosforanu fludarabiny Doktorantka obserwowała spadek rozpuszczalności leku po utworzeniu koniugatu z dendrymerem na skutek wytrącania się kompleksu. Fakt ten spowodował brak możliwości wyznaczenia miejsc aktywnych w cząsteczce PPI G4, mogących przyłączyć pochodną fludarabiny, co zostało obliczone w przypadku pozostałych ligandów.

Wykorzystując metodę dializy równowagowej Doktorantka ponownie scharakteryzowała stechiometrię tworzonych kompleksów, otrzymując wyniki niższe niż w metodzie spektrofotometrycznej. Doktorantka przedstawiła prawdopodobne przyczyny zaobserwowanych różnic, jednakże nie odniosła się do tego, jakie korzyści daje każda z tych metod i jak interpretować różne wyniki oraz czy stosowanie obu metod do wyznaczania liczby miejsc aktywnych jest zasadne. Dializa równowagowa pozwoliła na wyznaczenie stałej wiązania kompleksów, którą obliczono także na podstawie izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego. Ta technika umożliwiła jednocześnie wyznaczenie zmiany entalpii reakcji kompleksowania, zmiany entropii oraz powinowactwa ligandów do PPI G4. Najwyższą zmianą entalpii charakteryzowało się kompleksowanie PPI G4 z monofosforanem fludarabiny. Badanie kalorymetryczne wykazało samorzutny charakter tworzenia się kompleksów. Stałe wiązania wyznaczone różnymi metodami różniły się, podobnie jak liczba miejsc aktywnych, czy wzrost rozpuszczalności leków.

Mimo że zastosowane metody analityczne wykazały różną stechiometrię wiązania leków z dendrymerem, to stwierdzić można, że zróżnicowane metody pozwoliły na wyznaczenie pewnych tendencji. Monofosforan fludarabiny przyłączał się do PPI G4 w największych ilościach, jednakże nie zwiększało to rozpuszczalności leku. Wzrost rozpuszczalności był bardziej intensywny w przypadku cząsteczek o większej hydrofobowości.

Technika ^1H NMR pozwoliła Doktorantce na ustalenie przyczyn bardziej wydajnego wiązania monofosforanu fludarabiny z dendrymerem, którą był charakter anionowy liganda, umożliwiającą elektrostatische wiązanie z grupami aminowymi PPI G4, a z kolei 5-fluorouracyl oraz tegafur oddziaływały z powierzchniowymi grupami metylenowymi dendrymeru. Jest to nowa wiedza, która stanowi indywidualny wkład Doktorantki w rozwój nauk chemicznych

O ile w literaturze przedmiotu znaleźć można wiele doniesień dotyczących kompleksów PPI G4 z badanymi lekami i z tyrozyną, to kompleksy z tryptofanem właściwie nie były analizowane w zakresie przyłączania do tego rodzaju dendrymerów. Tryptofan, jak wiadomo, ma kluczowe znaczenie dla wielu funkcji metabolicznych, jest niezbędny do syntezy białek, ale, co bardzo ważne, jest również substratem do syntezy serotoniny w mózgu. W sytuacji deficytu tryptofanu w diecie szczególnie znaczenie może mieć suplementacja tego aminokwasu. Wykazano, co istotne, zdolność do wzrostu szybkości syntezy serotoniny w mózgu poprzez zwiększanie stężeniami tryptofanu w surowicy. Badania eksperymentalne wykazały, że zależna od tryptofanu synteza serotoniny w mózgu jest ważnym czynnikiem zaangażowanym w kształtowanie nastroju, zachowań, jak również procesów poznawczych. Ponadto badania kliniczne dostarczyły wstępnych dowodów na skuteczność L-tryptofanu w leczeniu zaburzeń psychicznych, szczególnie gdy jest stosowany w połączeniu z innymi środkami terapeutycznymi. Przedstawione w dysertacji badania kompleksów PPI G4-L-tryptofan mgr Malinowskiej uważam za bardzo ważne ze względu na dostarczenie nowych danych, które są obiecujące w kontekście zwiększenia biodostępności tryptofanu, poprzez możliwość zwiększania jego rozpuszczalności w środowisku wodnym. Jest to również istotny indywidualny wkład Doktorantki w rozwój nauk chemicznych. Badania te powinny być kontynuowane w modelach *in vivo*.

Uwagi krytyczne

Cel pracy został zamieszczony we Wstępie, choć zwyczajowo jest on formułowany po przeglądzie literatury, jako odpowiedź na potrzeby badawcze wynikłe z analizy dostępnej literatury i po sformułowaniu hipotez badawczych, których zresztą w pracy zabrakło.

W odniesieniu do nośników leków bardzo ważnym zagadnieniem jest badanie trwałości otrzymywanych kompleksów. W pracy Doktorantka nie analizowała trwałości kompleksów w roztworach buforowych charakterystycznych dla płynów ustrojowych w związku z czym zabrakło danych pokazujących, na ile otrzymane kompleksy mają potencjał terapeutyczny.

Format zastosowany w wykazie cytowanej literatury nie obejmuje tytułów artykułów. Z tego względu trudno jest zidentyfikować i ocenić powiązanie danego źródła z konkretnym fragmentem pracy.

Część metodyczna zawiera niewiele odniesień do źródeł literaturowych, co sugeruje, nie wiem, czy słusznie, że Doktorantka wykorzystywała w badaniach metody autorskie, np. badanie potencjału Zeta, ale także inne.

W rozdziale dotyczącym Wyników pomiarów i ich interpretacji zacytowano niewiele ponad 20 pozycji literaturowych, z których niespełna połowa ukazała się w ostatnim 10-leciu. Dorobek innych autorów, choć jest w tej tematyce całkiem pokaźny, został potraktowany przez Doktorantkę z dużym dystansem. Spowodowało to, że Pani mgr Malinowska nie mogła w pełni wyeksponować innowacyjności swoich badań i pokazać ich wpływu na rozwój dyscypliny naukowej. Biorąc pod uwagę imponującą liczbę doniesień naukowych, ukazujących się każdego roku, dotyczących

kompleksowania leków z dendrymerami, można byłoby nadać dyskusji wyników większą aktualność właśnie poprzez liczniejsze cytowanie prac z ostatniej dekady.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Praca zawiera nieliczne błędy o charakterze edytorskim. Na Rys. 54 błędnie przedstawiono wzór strukturalny L-tyrozyny, w którym zamiast grupy karbonylowej znalazła się grupa metylenowa. Na Rys. 70 w opisie pojawiło się dwukrotnie odniesienie do linii niebieskiej, zamiast do niebieskiej i czerwonej, w zależności od stężenia ligandu. Nieliczne odnotowane pomyłki nie wpływają w żaden sposób na obniżenie wysokiej wartości naukowej rozprawy doktorskiej.

Ocena końcowa

Stwierdzam, że mgr Małgorzata Malinowska wykazała się umiejętnościami oryginalnego rozwiązywania problemu naukowego i zrealizowała cel postawiony w pracy. Rozprawa doktorska prezentuje znajomość ogólnej wiedzy Doktorantki w dyscyplinie nauki chemiczne i potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Recenzowana rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Malinowskiej spełnia warunki określone Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki chemiczne o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Malinowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

