Poznań, dnia 12 marca 2023 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Malinowskiej pt. „Badania oddziaływań dendrymeru PPI G4 z wybranymi lekami i aminokwasami w środowisku wodnym", wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr. hab. Bartłomieja Pałecza i dr. hab. Adama Buczkowskiego, w Katedrze Chemii Fizycznej w Zakładzie Chemii Biofizycznej Uniwersytetu Łódzkiego

Podstawą sporządzenia recenzji jest pismo prof. dr hab. Sławomiry Skrzypek, Dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego z dnia 22.02.2023 roku

Celem pracy doktorskiej pod tytułem „Badania oddziaływań dendrymeru PPI G4 z wybranymi lekami i aminokwasami w środowisku wodnym" było zbadanie oddziaływań w środowisku wodnym dendrymeru PPI G4 z wybranymi ligandami: lekami onkologicznymi: 5-fluorouracylem, 5-jodouracylem, tegafurem, monofosoranem fludarabiny i azydotymidyną oraz dwoma aminokwasami: L-α-tyrozyną oraz L-α-tryptofanem. Tematyka pracy doktorskiej jest aktualna i perspektywiczna zarówno w aspekcie poznawczym, jak i aplikacyjnym. Udoskonalenie leków w taki sposób, aby eliminowały komórki rakowe przy jednoczesnym jak najmniejszym uszkodzeniu zdrowych komórek gospodarza, to jedno z wyzwań współczesnej farmacji i medycyny. W tym celu bada się różnorodne nośniki leków takie jak dendrymery, które stanowią pewnego rodzaju opakowanie dla związków bioaktywnych bardzo często niestabilnych w warunkach in vivo. Dzięki cząsteczkom gospodarza lek zostaje odizolowany od środowiska zewnętrznego, chroniony jest przed inaktywacją oraz spowolniony jest proces jego uwalniania, przez co zmniejsza się jego toksyczność z równoczesnym wydłużeniem czasu działania.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana pod opieką naukową prof. dr. hab. Bartłomieja Pałecza oraz dr. hab. Adama Buczkowskiego, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Praca doktorska mgr Małgorzaty Malinowskiej została przedstawiona w formie zawierającej wszystkie niezbędne elementy wymagane w dysertacjach naukowych. Praca została napisana w języku polskim w tradycyjnej formie. Rozprawa jest napisana poprawnym językiem

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań
tel. 604-817-938
e-mail: schroede@amu.edu.pl

naukowym w sposób przejrzysty, jednoznaczny i z zachowaniem spójności wypowiedzi, liczy 237 stron maszynopisu i jest podzielona na klasyczne rozdziały: wstęp i cele pracy, część teoretyczną (59 stron), część eksperymentalną (19 stron), wyniki pomiarów i ich interpretacja (64 strony), podsumowanie, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bibliografię. Przegląd literaturowy oraz dyskusja wyników została przygotowana w oparciu o 219 pozycji literaturowych, obejmujących najważniejsze doniesienia naukowe dotyczące tematyki rozprawy doktorskiej. Całość pracy zakończona jest załącznikiem zawierającym: dodatkowe dane eksperymentalne oraz obliczenia, kopie dwóch publikacji powstałych w oparciu o badania opisane w pracy doktorskiej opublikowane w Journal of Molecular Liquids w latach 2020 i 2021 oraz dorobek naukowy mgr Małgorzaty Malinowskiej obejmujący 4 publikacje naukowe, rozdział w monografii oraz 24 doniesienia na konferencjach naukowych.

Autorka pracy doktorskiej w części teoretycznej skupiła się na trzech tematach: strukturze ciekłej wody, dendrymerach oraz na badanych ligandach - lekach i aminokwasach- L-tyrozynie i L-tryptofanie. Doktorantka swoje badania prowadzi w środowisku wodnym. Rozdział „Struktura ciekłej wody" wprowadza czytelnika w problematykę bardzo szeroko badaną i dyskutowaną przez naukowców w ostatnich latach. Znajomość budowy ciekłej wody, jej struktury klastrowej i wynikające z niej unikalne właściwości rozpuszczalnika powinna rozpoczynać każde badania mechanizmów reakcji w środowisku wodnym. Związki chemiczne nazywane dendrymerami to dzisiaj bardzo duża grupa polimerów o złożonej budowie i specyficznych właściwościach. W drugim rozdziale części teoretycznej mgr M. Malinowska przedstawiła w oparciu o literaturę naukową budowę, metody otrzymywania i właściwości fizykochemiczne dendrymerów polipropylenoiminowych (PPI). To opracowanie jest przygotowane bardzo starannie i uwzględnia moim zdaniem całą istotną literaturę z tego zakresu, co wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki do prowadzenia własnych badań eksperymentalnych. W trzecim rozdziale części teoretycznej zostały przedstawione podstawowe informacje fizykochemiczne o badanych związkach chemicznych: lekach i aminokwasach. Charakterystykę dendrymer PPI G4 przedstawiła w rozdziale poprzednim omawiając polimery dendrymerowe. Przedstawione informacje dotyczące budowy, właściwości i medycznego zastosowania wybranych związków chemicznych mają uzasadniać czytelnikowi celowość podjętych badań nad oddziaływaniem ich z dendrymerem PPI G4 w środowisku wodnym.

W rozdziale Część eksperymentalna mgr Małgorzata Malinowska omówiła podstawy teoretyczne oraz procedury wyznaczania parametrów fizykochemicznych tworzenia kompleksów receptor molekularny-ligand/cząsteczka gościa za pomocą technik: spektroskopowych, dializy równowagowej, potencjału Zeta oraz kalorymetrii izotermicznej. Opis metodologii badań jest

bardzo precyzyjny, co gwarantuje poprawność i wiarygodność wyników eksperymentalnych uzyskanych przez mgr M. Malinowską.

W rozdziale Wyniki pomiarów i ich interpretacja autorka dysertacji doktorskiej przedstawiła wyniki uzyskane w badaniach reakcji tworzenia kompleksów PPI G4 z lekami i aminokwasami w środowisku wodnym w kolejności stosowanych metod analitycznych. Na podstawie pomiarów pH-metrycznych wodnych roztworów dendrymeru PPI G4 mgr M. Malinowska określiła stopień protonowania powierzchniowych pierwszorzędowych grup aminowych makrocząsteczki PPI G4. Na podstawie pomiarów spektroskowych UV-Vis wyznaczyła rozpuszczalność: 5-fluorouracylu, 5-jodouracylu, tegafuru, azydotymidyny, monofosoranu fludarabiny, L-α-tryptofanu oraz L-α-tyrozyny w wodnych roztworach dendrymeru PPI G4 o wzrastającym stężeniu oraz obliczyła na tej podstawie liczbę miejsc aktywnych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 wiążących cząsteczki liganda w środowisku wodnym. Wyniki badań rozpuszczalności wskazują, że makrocząsteczka PPI G4 przyłącza więcej cząsteczek tegafuru i 5-jodouracylu o silniejszych właściwościach hydrofobowych niż 5-fluorouracylu. Stosują metodę dializy równowagowej Doktorantka wyznaczyła równowagowy rozkład liganda (5-fluorouracylu, 5-jodouracylu, tegafuru, azydotymidyny, monofosforanu fludarabiny, L-α-tryptofanu) pomiędzy fazę wodną i fazę z dendrymerem PPI G4. Wykorzystując równanie Scatcharda-Klotza dla jednego rodzaju miejsc aktywnych obliczyła liczbę miejsc aktywnych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 wiążących cząsteczki liganda oraz stałą wiązania ligand-miejsce aktywne w makrocząsteczce dla badanych leków oraz L-α-tryptofanu. Wyniki dializy równowagowej wskazują, że makrocząsteczka dendrymeru PPI G4 przyłącza najwięcej cząsteczek monofosforanu fludarabiny spośród badanych cząsteczek gościa. Liczba przyłączonych cząsteczek (n) leków oraz L-α-tryptofanu do makrocząsteczki dendrymeru PPI G4 wynosi od około 10 do 30 cząsteczek liganda. Podczas gdy stałe wiązania ligand-receptor dla układu dendrymer PPI G4-lek oraz dendrymer PPI G4-L-tryptofan mieszczą się w zakresie od około 300 do 1000. Obliczone parametry fizykochemiczne wiązania 5-fluorouracylu z dwoma rodzajami miejsc aktywnych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 potwierdzają opisane w literaturze wysokie powinowactwo tego leku do makrocząsteczki PPI G4. Metodą miareczkowania kalorymetrycznego autorka pracy wyznaczyła parametry fizykochemiczne oddziaływań dendrymeru PPI G4 z 5-fluorouracylem, 5-jodouracylem, tegafurem, azydotymidyną, monofosoranem fludarabiny oraz z L-α-tryptofanem. Wyznaczyła liczbę miejsc aktywnych w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 wiążących cząsteczki liganda, stałą wiązania ligand-miejsce aktywne w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4, wartości standardowej entalpii, entropii oraz entalpii swobodnej. Badania kalorymetryczne ITC wskazały, że makrocząsteczka PPI G4 wiąże około 40 cząsteczek monofosforanu fludarabiny z powinowactwem wyższym niż pozostałe badane ligandy. Najbardziej egzotermiczny efekt

oddziaływań liganda z miejscem aktywnym makrocząsteczki PPI G4 obserwuje się dla monofosforanu fludarabiny, natomiast najmniej egzotermiczny efekt obserwuje się dla L-α-tryptofanu. Wyznaczone standardowe entalpie swobodne oddziaływań wszystkich ligandów z miejscami aktywnymi makrocząsteczki PPI G4 wskazują, że proces tworzenia kompleksu jest termodynamicznie samorzutny. Na podstawie badań ^{1}H NMR mieszanin dendrymeru PPI G4 o wzrastającym stężeniu 5-fluorouracylu, 5-jodouracylu, tegafuru, azydotymidyny, monofosforanu fludarabiny, L-α-tryptofanu i L-α-tyrozyny w wodzie ciężkiej D_2O wskazano grupy funkcyjne dendrymeru PPI G4 zaangażowane w wiązanie cząsteczek: leków oraz L-α-tryptofanu i L-α-tyrozyny. Dokonano pomiaru potencjału Zeta dendrymeru PPI G4 w wodnym roztworze 5-flurouracylu o wzrastającym stężeniu wyznaczając na jego podstawie liczbę miejsc aktywnych w cząsteczce dendrymeru PPI G4 wiążących cząsteczki 5-fluorouracylu. Uzyskane wyniki pomiarów za pomocą wielu metod analitycznych pozwoliły mgr Małgorzacie Malinowskiej na przedstawienie, dobrze udokumentowanego eksperymentalnie, mechanizmu wiązania przez dendrymer PPI G4 wybranych leków antynowotworowych oraz wybranych aminokwasów w wodzie. Rezultaty badań, bardzo istotne dla celów medycznych, otwierają możliwość rozpoczęcia studiów nad zastosowaniem badanych układów w terapii antynowotworowej, jako leków o przedłużonym działaniu.

Analiza uzyskanych wyników nasuwa kilka pytań, które planuję przedyskutować z Doktorantką w trakcie publicznej obrony, dotyczą one przede wszystkim zastosowania badanych układów w farmacji i medycynie. Mieszanina kompleksu dendrymer-lek oraz wolnego leku to literaturowy model leku o przedłużonym działaniu, w którym w żywych organizmach w pierwszym okresie działanie biologiczne spoczywa na wolnym leku, a w dłuższym okresie czasu na leku uwolnionym z kompleksu. Aby zastosować badane układy jak leki o przedłużonym działaniu nasuwają się pytania:

1. Czy i w jakich warunkach można wyizolować kompleks PPI G4-lek z roztworu? Jaka jest stechiometria PPI G4/lek w wyizolowanym kompleksie?
2. Jak przedstawia się konkurencyjność tworzenia kompleksów PPI G4 z lekami w stosunku do innych kwasów obecnych w roztworze wodnym?
3. Jakie czynniki fizykochemiczne mogą powodować rozkład kompleksu PPIG4-lek i uwolnienie leku?

W trakcie realizacji pracy doktorskiej mgr Małgorzata Malinowska podjęła się przeprowadzić bardzo czasochłonne i precyzyjne badania rozpuszczalności oraz oddziaływania badanych leków w wodzie w obecności dendrymeru PPI G4 uzyskując wyniki, które są konieczne do dalszych

badań nad zastosowaniem tego typu układów, jako leków antynowotworowych o przedłużonym działaniu. Cele przedstawione we wstępie rozprawy doktorskiej zostały w pełni osiągnięte a część wyników została opublikowana w specjalistycznych czasopismach o obiegu światowym.

Reasumując, zgodnie z art. 187 ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" przedstawiona rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną mgr Małgorzaty Malinowskiej w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki chemiczne oraz potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przedstawione rezultaty w rozprawie doktorskiej stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Do najważniejszych osiągnięć naukowych w obszarze chemii fizycznej, supramolekularnej oraz medycznej zaliczam: przeprowadzenie kompleksowych badań kilkoma technikami analitycznymi oddziaływań dendrymeru PPI G4 z wybranymi lekami oraz aminokwasami w celu wyznaczenia liczby aktywnych miejsc w makrocząsteczce dendrymeru PPI G4 zdolnych do wiązania cząsteczek liganda, jak również wyznaczenie stałych równowagi wiązania ligand-makrocząsteczka receptora oraz wartości standardowych funkcji termodynamicznych: entalpi ΔH, entropi ΔS oraz entalpi swobodej ΔG wiązania badanych ligandów z makrocząsteczką receptora.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Malinowskiej pt. „Badanie oddziaływań dendrymeru PPI G4 z wybranymi lekami i aminokwasami w środowisku wodnym", zawiera pełną dokumentację przeprowadzonych badań i spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 17 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 201 r. poz. 166) oraz w paragrafie 5.2 rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora. W związku z tym, wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Małgorzaty Malinowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie Jej stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie chemia.

G. Schroeder

PODPIS ZAUFANY
GRZEGORZ
SCHROEDER
12.03.2023 11:58:02 [GMT+1]
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

prof. dr hab. Grzegorz Schroeder