

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Joanny Drozdowskiej

pod tytułem

„Synteza i analiza aktywności biologicznej zmodyfikowanych dendrymerów poliamidoaminowych generacji trzeciej podstawionych wybranymi związkami z grupy ksantonów, jako potencjalnych czynników w terapii przeciwnowotworowej i przeciwnicieniowej”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Drozdowskiej została wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Wojciecha Rode oraz Dr hab. Łukasza Urama, prof. PRZ na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy opracowania oraz charakterystyki fizykochemicznej oraz biologicznej koniugatów dendrymerów poliamidoaminowych generacji trzeciej podstawionych wybranymi związkami z grupy ksantonów z kowalencyjnie przyłączoną α -mangostyną lub vadimezanem. Tematyka pracy doktorskiej tym samym koncentruje się na niezwykle istotnym dla farmakologii oraz medycyny zagadnieniu związanym z opracowywaniem nowych efektywnych systemów dostarczania leków do komórek, a także poszukiwaniem aktywnych biologicznie kombinacji związków pochodzenia naturalnego względem komórek nowotworowych, a także nicieni. W szczególności Doktorantka w swojej pracy zajęła się oceną potencjału przeciwnowotworowego i przeciwnicieniowego wybranych związków z grupy ksantonów jako kandydatów do wiązania z nośnikiem polimerowym, opracowaniem procedury syntezy szeregu koniugatów dendrymeru poliamidoaminowego generacji trzeciej ze związkami z grupy ksantonów (α -mangostyna i vadimezan) z uwzględnieniem: użycia C-D-glukoheptono-1,4-laktonu w celu zmniejszenia natywnej toksyczności nośnika, zastosowania biotyny jako cząsteczki adresującej i/lub zwiększającej wychwyty przez komórki, różnych sposobów wiązania ksantonów do dendrymeru (poprzez wiązania amidowe lub estrowe), różnego stopnia podstawienia resztami α -mangostyny, charakterystyką otrzymanych koniugatów metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego oraz techniką dynamicznego rozpraszania światła oraz oceny aktywności biologicznej otrzymanych koniugatów względem ludzkich komórek nowotworowych:

komórek raka płaskonabłonkowego z języka (SCC-15) i komórek glejaka wielopostaciowego IV stopnia (U-118 MG). Doktorantka dokonała także oceny biokompatybilności otrzymanych modyfikowanych dendrymerów PAMAM względem komórek prawidłowych fibroblastów skórnym linii BJ.

Należy zaznaczyć, że pomimo licznych prac dostępnych w bazie Pubmed, w której na dzień sporządzania recenzji znajduje się ponad 900 rekordów dotyczących tematyki dendrymerów PAMAM oraz ich zastosowania względem komórek nowotworowych przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska istotnie poszerza dotychczasową wiedzę oraz stanowi przyczynek do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego. Postawiony cel naukowy spełnia tym samym wymóg niezbędny dla uznania ocenianej pracy doktorskiej za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się praca doktorska.

Rozprawę doktorską Pani mgr inż. Joanny Drozdowskiej stanowi zbiór 4 artykułów opublikowanych w latach 2019-2022 roku w recenzowanych zagranicznych czasopismach znajdujących się w aktualnym wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych MEiN. Są to następujące prace:

- 1) **Markowicz Joanna***, Uram Łukasz, Sobich Justyna, Mangiardi Laura, Maj Piotr, Rode Wojciech. Antitumor and anti-nematode activities of α -mangostin. European Journal of Pharmacology. 2019 Nov 15; 863:172678. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172678.
- 2) Maj Piotr, Mori Mattia, Sobich Justyna, **Markowicz Joanna**, Uram Łukasz, Zieliński Zbigniew, Quaglio Deborah, Calcaterra Andrea, Cau Ylenia, Botta Bruno, Rode Wojciech*. Alvaxanthone, a Thymidylate Synthase Inhibitor with Nematocidal and Tumoricidal Activities. Molecules. 2020 Jun 23;25(12):2894. doi: 10.3390/molecules25122894
- 3) **Markowicz Joanna***, Uram Łukasz, Wołowicz Stanisław, Rode Wojciech*. Biotin Transport-Targeting Polysaccharide-Modified PAMAM G3 Dendrimer as System Delivering α -Mangostin into Cancer Cells and C. elegans Worms. International Journal of Molecular Sciences. 2021 Nov 29;22(23):12925. doi: 10.3390/ijms222312925
- 4) **Markowicz Joanna***, Wołowicz Stanisław, Rode Wojciech, Uram Łukasz. Synthesis and Properties of α -Mangostin and Vadimezan Conjugates with Glucoheptoamidated and Biotinylated 3rd Generation Poly(amidoamine) Dendrimer, and Conjugation Effect on Their Anticancer and Anti-Nematode Activities. Pharmaceutics. 2022 March 10;14(3):606. doi: 10.3390/pharmaceutics14030606

Prezentacja zbioru artykułów została poprzedzona streszczeniem w języku polskim oraz angielskim, wprowadzeniem teoretycznym, opisem celi naukowych pracy, zwięzłym przedstawieniem części eksperymentalnej, syntetycznym przedstawieniem głównych wyników badań, a także podsumowaniem, bibliografią wykorzystaną do przygotowania w/w omówienia oraz wykazem rycin i tabel. Do pracy doktorskiej załączono wykaz osiągnięć naukowych Doktorantki, oświadczenia Doktorantki oraz współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej opisujące rolę Doktorantki oraz współautorów w postawianiu w/w publikacji.

Na podkreślenie zasługuje fakt, iż artykuły stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej to prace prezentujące wyłącznie oryginalne wyniki eksperymentalne, w których Doktorantka zajmuje miejsce pierwszego autora w pracach naukowych opublikowanych w czasopiśmie European Journal of Pharmacology, International Journal of Molecular Sciences oraz Pharmaceutics. Udział Doktorantki w powstaniu w/w artykułów polegał m.in., na współtworzeniu koncepcji badań, wyborze metodologii badań, wykonaniu eksperymentów z użyciem hodowli komórkowych *in vitro*, analizie fizyko-chemicznej dendrymerów, analizie otrzymanych danych, opracowaniu wyników, redakcji manuskryptu, odpowiedziach na uwagi recenzentów.

W artykule 2 (praca opublikowana w czasopiśmie Molecules) udział Doktorantki polegał na wykonaniu eksperymentów z udziałem hodowli komórkowych *in vitro* oraz opracowaniu wyników.

Udział pozostałych autorów w/w publikacji polegał m.in. na wykonaniu niektórych eksperymentów, udziale w syntezy natywnych dendrymerów, przeprowadzeniu niektórych pomiarów fizyko-chemicznych koniugatów, wykonaniu eksperymentów z hodowlami nicieni, udziale w eksperymentach enzymologicznych, wykonaniu analiz *in silico*, dostarczaniu nutraceutyków do analiz, a także pomocy w redagowaniu tekstów manuskryptów czy doborze metodyki.

Opis udziału Doktorantki oraz współautorów dotyczący powstania każdej z w/w publikacji został dokonany dokładnie i nie budzi zastrzeżeń co do rzeczywistego udziału Doktorantki w pracach badawczych będących podstawą każdej z publikacji.

Przedłożone do oceny oświadczenia są zgodne z deklaracjami zawartymi w publikacjach w sekcji 'Authors' contribution'. Jedyną uwagę jaką chciałbym w tym zakresie

poczynić to zbędne podawanie udziału procentowego w oświadczeniach przez Doktorantkę oraz współautorów.

Pierwsza z cyklu praca zatytułowana „Antitumor and anti-nematode activities of α -mangostin” dotyczyła charakterystyki właściwości biologicznych α -mangostyny względem komórek nowotworowych i prawidłowych oraz organizmu modelowego nicienia *Caenorhabditis elegans*. Doktorantka wraz ze współautorami wykazała, że działanie cytotoksyczne α -mangostyny wobec komórek nowotworowych oraz prawidłowych związane było z indukcją apoptozy przez ten związek. Komórki nowotworowe były ogólnie bardziej wrażliwe na stymulację α -mangostyną, w szczególności komórki raka płaskonabłonkowego SCC-15. Efektywne stężenie α -mangostyny powodujące m.in., wzrost aktywności kaspazy 3 oraz 7 oraz zmiany w poziomie wewnątrzkomórkowego ATP, a także obniżenie adhezji i migracji komórek nowotworowych był obserwowany przy stężeniu 10 μ M, a w komórkach prawidłowych przy stężeniu 20 μ M α -mangostyny. α -Mangostyna powodowała także inhibicję wzrostu mieszanej populacji nicieni z LC50 równym 3,8 μ M \pm 0,5 μ M. Należy podkreślić, że wykorzystanie w pracy różnych modeli eksperymentalnych do charakterystyki aktywności biologicznej α -mangostyny wnosi nowe informacje w zakresie potencjalnego jej farmakologicznego zastosowania.

W drugiej z cyklu pracy zatytułowanej „Alvaxanthone, a Thymidylate Synthase Inhibitor with Nematocidal and Tumoricidal Activities” Doktorantka oraz współautorzy skoncentrowali swoją uwagę na przeanalizowaniu właściwości przeciwnowotworowych sześciu ksantonów, wyselekcjonowanych z biblioteki związków naturalnych. Badania wykazały, że działanie toksyczne w badanym zakresie stężeń wobec analizowanych komórek, tj. nowotworowych linii komórkowych U-118 MG oraz SCC-15 oraz linii komórek prawidłowych fibroblastów wykazały tylko trzy związki: alwaksanton, rhediaksanton B oraz rhediaksanton C. Dodatkowo, publikacja pracy Doktorantki z użyciem hodowli linii komórkowych *in vitro* została poprzedzona obszernym skринingiem potencjalnych inhibitorów syntazy tymidylanowej z wykorzystaniem izolowanego enzymu, a także oceną cytotoksyczności w/w związków względem nicienia *Trichinella spiralis* and *C. elegans*. Część eksperymentalna dotycząca inhibitorów syntazy tymidylanowej z wykorzystaniem nicienia była prowadzona we współpracy promotora pracy doktorskiej - prof. dr hab. Wojciecha Rode z zespołem prof. Bruno Botty z Uniwersytetu La Sapienza w Rzymie. Opisywana przeze mnie publikacja bardzo dobrze uzasadnia dobór związków do dalszych analiz, ponieważ z jednej

strony wskazuje na potencjalne nowe możliwości ich stosowania, a jednocześnie pokazuje ich możliwe ograniczenia aplikacyjne jako potencjalnych terapeutyków.

W trzeciej z cyklu pracy zatytułowanej „Biotin Transport-Targeting Polysaccharide-Modified PAMAM G3 Dendrimer as System Delivering C-Mangostin into Cancer Cells and *C. elegans* Worms” Doktorantka wykonała syntezę, charakterystykę fizyko-chemiczną oraz analizę właściwości biologicznych koniugatów dendrymeru PAMAM G3 z amidowo związanymi α -mangostyną oraz biotyną, wykorzystując te same co we wcześniejszych dwóch pracach modele badawcze. Dzięki opracowanej technologii przyłączenia α -mangostyny do dendrymeru PAMAM G3 Doktorantce oraz zespołowi współautorów udało się istotnie zwiększyć toksyczność otrzymanego koniugatu wobec testowanych komórek oraz nicienia w porównaniu z wolną postacią α -mangostyny. Doktorantka jednocześnie wskazuje, że efekt ten był ściśle zależny od stopnia podstawienia nośnika przez badany lek. Cennym elementem tej pracy w ocenie recenzenta było wzbogacenie koniugatów o biotynę oraz znacznik fluorescencyjny, co ma znaczenie dla potwierdzenia faktu jego efektywnego pobierania oraz biodostępności dla komórek.

W czwartej z cyklu pracy zatytułowanej „Synthesis and Properties of α -Mangostin and Vadimezan Conjugates with Glucoheptoamidated and Biotinylated 3rd Generation Poly(amidoamine) Dendrimer, and Conjugation Effect on Their Anticancer and Anti-Nematode Activities” Doktorantka skoncentrowała się na dalszym ulepszaniu procedury syntezy koniugatu dendrymeru PAMAM G3 z estrowo związanymi α -mangostyną oraz biotyną, analogicznego koniugatu z estrowo związanym vadimezanem, a także koniugatu z vadimezanem związanym amidowo, a następnie jego charakterystyce fizyko-chemicznej oraz analizie jego właściwości biologicznych. Doktorantce udało się zwiększyć cytotoksyczną aktywność α -mangostyny względem komórek nowotworowych dzięki zastosowaniu m.in. nośnika G^{3gh} oraz wiązania estrowego, co również zwiększyło aktywność analizowanego ksantonu (2,5—9-cio krotnie w zależności od rodzaju komórek). Wzrost toksyczności wynikający z estrowego wiązania α -mangostyny z nośnikiem dendrymerowym G^{3gh}, Doktorantka zaobserwowała również wobec nicienia *C. elegans*. Natomiast Doktorantka wykazała jednocześnie, że wiązanie vadimezanu z biotynylowanym dendrymerem PAMAM G3 poprzez wiązanie amidowe czy estrowe nie zwiększyło istotnie toksyczności związku wobec żadnych z analizowanych linii komórkowych oraz nicienia *C. elegans*.

Wszystkie załączone prace stanowią spójny tematycznie zbiór artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych określanych przez ministra właściwego do spraw nauki, tym samym warunek ustawowy jaki powinna spełniać praca doktorska w tym zakresie należy uznać za spełniony.

Podsumowując, recenzent ocenia wysoko wartość merytoryczną wszystkich artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Należy zaznaczyć, że otrzymane wyniki podlegały rygorystycznym procedurom specjalistycznej recenzji zewnętrznej oraz przez członków rad redakcyjnych, w których zostały opublikowane. Opis wykorzystanych układów eksperymentalnych oraz zastosowanych technik w artykułach prezentujących oryginalne wyniki został dokonany z należytą starannością lub z właściwymi odnośnikami literaturowymi i pozwala na dokładne prześledzenie wszystkich etapów przeprowadzonych eksperymentów. Zastosowane metody zostały dobrane i użyte odpowiednio dla weryfikacji hipotezy badawczej oraz osiągnięcia zdefiniowanych przez Doktorantkę celów pracy doktorskiej. Recenzent nie ma wątpliwości, że jakość merytoryczna oraz zastosowane metody świadczą o bardzo dobrym warsztacie Doktorantki. Forma prezentacji wyników oraz ich opis w artykułach naukowych została usystematyzowana w sposób tworzący logiczny ciąg zmierzający do udzielenia odpowiedzi na zdefiniowane w artykułach oraz pracy doktorskiej cele.

Rola recenzenta oceniającego pracę doktorską w formie zbioru kilku publikacji polega przede wszystkim na ocenie rzeczywistego udziału Doktorantki w osiągnięciu naukowym zgłaszanym jako podstawę do nadania stopnia doktora, spójności cyklu publikacji oraz ich wartości merytorycznej. W związku z powyższym, chciałbym podkreślić, że recenzent nie wnosi zastrzeżeń do w/w aspektów oceny. Natomiast z racji ciekawości naukowca chciałbym zadać doktorantce kilka pytań dotyczących prezentowanych w publikacjach wyników, a mianowicie:

- 1) Czym dokładnie był podyktowany dobór tych konkretnych linii komórkowych do zainicjowania przeprowadzonych badań?
- 2) Co wiadomo o trwałości koniugatów w medium hodowlanym oraz ich interakcji ze składnikami pożywki hodowlanej? Czy monitorowano uwalnianie związków z koniugatów w środowisku pozakomórkowym?
- 3) Czy Doktorantka mogłaby omówić w jaki sposób mutacje, np. w genach *TP53*, *CDKN2A*, *CDKN1A*, *CASP3*, *BCL2* mogą mieć znaczenie dla stosowania badanych

związków/koniugatów? Co wiadomo o mutacjach tych genów w użytych modelach komórkowych?

- 4) Czy Doktorantka może wskazać główne ograniczenia związane ze stosowaniem opracowanych przez siebie dendrymerów w medycynie?
- 5) Czy stosowanie opracowanych koniugatów dendrymerów ma uzasadnienie ekonomiczne? Jaki jest średni koszt otrzymania koniugatu i czy zaproponowane rozwiązanie ma szansę zostać skomercjalizowane?

Wniosek końcowy

W podsumowaniu recenzji chciałbym stwierdzić, iż bardzo wysoko oceniam przedstawioną pracę doktorską Pani mgr inż. Joanny Drozdowskiej oraz stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane pracom doktorskim w myśl ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę — Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669, z późn. zm.) oraz ustawy z 20 lipca 2018 r. — Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1668 z późn. zm), ponieważ Doktorantka udowodniła, że samodzielnie potrafi rozwiązywać sformułowany problem naukowy poprzez odpowiednio zaplanowane eksperymenty, ich interpretację, krytyczną dyskusję oraz wyważone wnioski. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Rzeszowskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Drozdowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową wyników oraz opublikowane prace wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Rzeszowskiej o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Rzeszów, 09/01/2023

Dr hab. Maciej Wnuk, prof. UR

