



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Jana Procka „Projektowanie, wytwarzanie i charakteryzacja nanofarmaceutyków na przykładzie disulfiramu”.

Rozprawa doktorska mgr inż. Jana Procka „Projektowanie, wytwarzanie i charakteryzacja nanofarmaceutyków na przykładzie disulfiramu” jest monografią przedstawiającą wyniki badań dotyczących opracowania różnych strategii dostarczania disulfiramu i jego pochodnych do komórek nowotworowych z wykorzystaniem liposomowych nośników. Przygotowana w laboratorium prof. Marka Langnera, świadczy o dużym znawstwie zarówno problemów metodycznych jak i badanych obiektów.

Praca składa się z czterech głównych rozdziałów (*Wstęp, Materiały, Metody i połączone Wyniki z Dyskusją*), w których autor przedstawił podstawowe informacje dotyczące nanofarmaceutyków w terapii nowotworowej, disulfiramu - znanego od lat jako Esperal w leczeniu alkoholików, jego aktywności przeciwnowotworowej, nośników leków i raka wątrobowokomórkowego (24 strony), materiałów i metodologii eksperymentów (24 strony) tj. przygotowania liposomów, metodyki pomiaru rozmiarów agregatów, wykorzystania techniki chromatografii cieczowej (HPLC) do oznaczania zawartości disulfiramu i lipidu w błonach, oznaczania zawartości jonów miedzi wewnątrz liposomów, interakcji disulfiram-albumina i opis hodowli komórek nowotworowych w reakcji na disulfiram. Część dotyczącą wyników własnych i dyskusji (40 stron) autor zorganizował w logiczny ciąg, w którym przedstawił dane opisujące dostarczanie nanofarmaceutyków do komórek raka wątrobowokomórkowego, określenia lokalizacji disulfiramu w dwuwarstwie lipidowej, wykorzystania cyklodekstryn i jonów miedzi do zamykania disulfiramu, interakcji disulfiram-albumina i wreszcie aktywności przeciwnowotworowej disulfiramu dostarczonego w liposomach. Pracę zamyka *Podsumowanie* (3 strony) i 196 pozycji literaturowych.



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

Rozprawę otwiera nieco przydługie, ale zawierające istotne osiągnięcia, dwustronicowe *Streszczenie*, w którym znalazły się niezbyt szczęśliwe określenia, jak „administracja dwóch leków w nośniku”, w odniesieniu do umieszczenia, podawania, a nie zarządzania, czy „zbadano wpływ składu lipidowego wielkości gradientu jonów miedzi” – nie bardzo rozumiem jak można badać skład wielkości. Niestety takich potknięć natury redakcyjnej jest więcej i wymieniam je na końcu recenzji.

Wstęp jest wyczerpującym i interesującym opisem badanych obiektów i stosowanych metod na tle dostępnej literatury, chociaż Autor nie wykazał się pełną starannością np. w odniesieniu do cytowanej literatury, w której raz podawane są nazwiska wszystkich autorów, a w innych wyłącznie pierwszego. Również wysoką wartość merytoryczną osłabiają inne usterki natury technicznej. W tekście brak odniesienia do Rys 2. Na stronie 5 pojawiają się reszty aminokwasowe dehydrogenaz aldehydowych, a wśród nich glutamina, podczas gdy powinien być glutaminian. W schemacie reakcji (Rys. 2) wymienia się 5-metylotransferazę nie podając o jaką konkretnie chodzi a jest ich wiele. Nazwy związków (Rys 2.) są różnie pisane: raz z fragmentami angielskimi (*thio*) a innym polskimi (*tio*). Ze zdaniem „po zidentyfikowaniu nowego celu molekularnego skuteczność leku może być oceniana w fazie drugiej badań klinicznych” można dyskutować, gdyż droga od cząsteczki aktywnej i białka, które może być jej celem do badań klinicznych jest niezwykle długa i kosztowna. W dalszej części doktorant bardzo interesująco przedstawił teorie i modele rozrostu tkanek nowotworowych w tym model ewolucyjny nowotworowych komórek macierzystych Chiby i wsp. z 2016 r.

Kolejne strony to również interesujący opis interakcji disulfiram - jony Cu^{2+} i Zn^{2+} i ich roli w leczeniu guzów litych i wpływu nie tylko na dehydrogenazy aldehydowe, ale także szlak kinaz MAPK. Nieco denerwują skany w „mikroskali” wielu rysunków z oryginalnych publikacji z prawie nieczytelnymi opisami jak np. Rys. 5, podobnie jak w dalszej części pracy rysunki z wynikami.

Następne fragmenty dotyczą opisu metod leczenia raka wątrobowokomórkowego i w tym kontekście nanofarmaceutyków, które jak słusznie Autor zauważa nie rozwiązują problemu oporności wielolekowej ale zwiększają jego stężenie w tkance docelowej. W



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

końcu wstępnej części opisano techniki zamykania substancji w liposomach i warunki strukturalne, które musi spełniać liposom by stanowić skuteczny nośnik leku, a także niezwykle ważna informacja o publikacji z 2014 roku Liu i wsp., która opisuje badania o podobnej tematyce w stosunku do tego nad czym pracował Doktorant, tyle, że w odniesieniu do raka piersi. Ciekawe czy Autor pracy próbował się skontaktować z tą grupą w celu uzyskania informacji o procedurze przygotowania liposomów ew. czy ukazały się kolejne prace tych uczonych.

Cele i założenia pracy opisano jasno na jednej stronie chociaż można było ograniczyć się do pierwszego zdania o „*opracowaniu nanofarmaceutyku z disulfiramem*” i wypunktowanych na końcu celów szczegółowych. Reszta w gruncie rzeczy jest powtórzeniem streszczenia.

Zarówno opis *Materiałów*, jak i *Metod badawczych* nie budzi większych zastrzeżeń. Można oczywiście dyskutować ze stwierdzeniem (str. 35), że *HPLC jest jednym z najszerszej stosowanych narzędzi do oznaczania stężenia związków w mieszaninach*, czy brakiem chromatografii powinowactwa wśród technik chromatograficznych, a także zbyt szczegółowym opisem aparatu do HPLC czy detektora ELS. Natomiast pomysł by w tej części przedstawić przykładowe chromatogramy (Rys. 21-23) choć nowatorski jest do zaakceptowania, jakkolwiek równie dobrze można by je umieścić w wynikach, bądź suplemente. Drobną uwagę dotyczy Rys.23, na którym jednostki powierzchni wyraża się w mV/min! W dalszej części opisano autorską metodę oznaczania miedzi wewnątrz liposomów z użyciem czerni eriochromowej. Ponownie Rys. 27 i 28 są niezwykle mało czytelne. W szczególności na 2-gim i 3-cim panelu Rys.27 powinny być po cztery krzywe, a są po dwie, a pisanie widma *absorbcyjne*, zresztą powtórzone na następnej stronie i Rys. 60 jest wstydlive. Podpis do Rys. 28 (panel prawy), podobnie do innych zawierających dane eksperymentalne, jest niejasny i nie zawiera podstawowych danych eksperymentalnych. Wobec czułości metody oznaczania miedzi nasuwa się pytanie czy woda używana do eksperymentów była specjalnie przygotowywana w celu usunięcia jonów metali. W opisie badań interakcji disulfiram-albuminy pojawia się określenie dotyczące korekcji na *wewnętrzny efekt filtracyjny* gdy zapewne chodzi o



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

tw. efekt filtra wewnętrznego (ang. *inner filter effect*) związany z zanizaniem intensywności fluorescencji wobec zbyt stężonych roztworów fluorofora.

W następnym podrozdziale Doktorant szczegółowo opisał metodologię pomiaru stałej wiązania disulfiramu do albumin w oparciu o połączone analizy krzywych wygaszania fluorescencji reszt tryptofanowych albumin w modelu Sterna-Volmera i równania Scatcharda co było dość karkołomnym zadaniem z powodu stopnia komplikacji układu (fluorofory w różnym mikrootoczeniu, dość niskie wydajności kwantowe fluorescencji, potencjalnie różne miejsca wiązania itd.). Wydaje się, że krzywe S-V powinny być nieliniowe, a konieczne pomiary czasów życia stanów wzbudzonych. Z drugiej strony w przypadku reszt tryptofanowych mamy z reguły do czynienia z wieloskładnikowymi krzywymi zaniku fluorescencji np. dla HSA 0,8; 3,6 i 7,2 ns, a dla BSA układ się jeszcze bardziej komplikuje gdyż to białko ma dwie lub trzy reszty Trp (zależnie od ewentualnej sekwencji sygnałowej) czego niestety nie zauważono. Rys. 34 przedstawia schemat budowy aparatu do pomiarów kinetycznych techniką zatrzymanego przepływu. Prosiłbym o wyjaśnienie jaki wpływ może mieć dyfuzja w komorze pomiarowej wobec aż 60-cio sekundowego czasu pomiaru stopnia hemolizy.

Wyniki i dyskusja stanowią jeden rozdział co powoduje, że np. pierwszy podrozdział 6.1 zajmujący dwie i pół strony stanowi opis funkcjonowania wątroby nb. bardziej pasujący do *Wstępu* i nie zawiera wyników. W rozdziale 6.2 przedstawiono interesujące wyniki dotyczące lokalizacji disulfiramu w błonie lipidowej. Rozumiem, że Doktorant posługiwał się w obliczeniach oprogramowaniem fluorymetru to jednak błąd we wzorze 22 na anizotropię fluorescencji nie powinien się znaleźć w tekście, w którym w mianowniku zamieniono znak. Jeśli chodzi o interpretację wyników to nie do końca zgadzam się z wnioskiem płynącym z Rys. 39, wg którego disulfiram nie wpływa znacząco na uporządkowanie lipidów w liposomach. Wg mnie zmiana anizotropii na poziomie 0.04 to wcale nie taka mała zmiana i próbowałbym wynik zweryfikować metoda niezależną. Prosiłbym o komentarz w tym zakresie. Wnioski płynące z pomiarów czasów życia o centralnej lokalizacji disulfiramu w dwuwarstwie



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

lipidowej, wydają się poprawne i ważne w kontekście pracy jednak oryginalne krzywe zaniku niewątpliwie uwiarygodniłyby je jeszcze bardziej.

Wykorzystanie cyklodekstryn do biernego zamykania disulfiramu we wnętrzu liposomów samo w sobie nie stanowi nowości naukowej, natomiast ekstruzja żelu lipidowego w opisywanym układzie bez wątpienia jest i stanowi duże osiągnięcie recenzowanej pracy. Metoda pozwala na wydajne zamykanie dużych molekuł w liposomach. Jedynie mam wątpliwość czy rzeczywiście wydajność zamykania HP β CD zależy od stężenia związku (Rys. 45).

Kolejne interesujące rezultaty dotyczą aktywnego ładowania disulfiramu do liposomów na dwa sposoby: z wykorzystaniem EDTA jako chelatora niezamkniętych jonów miedzi i sacharozy jako regulatora ciśnienia osmotycznego. Niejasna dla mnie jest uwaga (str. 72) dotycząca buforowania roztworu i wydajności tworzenia kompleksu disulfiram-jony miedzi skoro w pracy nie badano wpływu buforu na tę reakcję, a zdanie na stronie 76, że pomiary aktywnego zamykania disulfiramu prowadzono w buforze Tris/NaCl pH 6 jest nie najbardziej precyzyjna, gdyż w tym pH Tris nie jest buforem (pK 8,06; zakres buforowania 7-9,2), chociaż na interpretację wyników nie powinno to mieć wpływu. Rys. 57-59 opisano jako widma emisyjne **tryptofanu** w HSA i BSA. Problem w tym, że BSA ma dwie reszty tryptofanowe i stąd interpretacja wyników dla albuminy wołowej jest bardzo problematyczna. Zresztą w obu przypadkach, przy wyznaczaniu stałych dysocjacji disulfiram-białko nie osiągnięto wysycenia (Rys. 61-63) co uniemożliwia ich poprawne wyznaczenie, a ewentualnie ocenę jakościową. Co więcej trudno interpretować dane z Tab. 10 skoro nie przedstawiono jednostek K_D . To samo dotyczy Rys. 65. i stałych asocjacji. Interpretując wyniki w oparciu o analizę Scatcharda dobrze byłoby przedstawić otrzymane krzywe. Doświadczenia recenzeta z ich stosowaniem w prostym przypadku interakcji białko – hormon, pokazują, jak niezwyklej precyzji pomiarów wymagają. Zmiany liczby miejsc wiążących w zakresie 0.5 – 1 (Rys.65) oznaczają, że wszystkie mają 1 miejsce i nie interpretowałbym ich jako większe czy mniejsze.

Końcowe wyniki bardzo ważnych i interesujących eksperymentów są związane z aktywnością przeciwnowotworową disulfiramu zamkniętego w liposomach.



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszyci

Wykorzystując nowotworowe linie komórkowe Autor w sposób wiarygodny przedstawił skuteczność disulfiramu wyrażającą się ograniczoną przeżywalnością komórek.

Pracę zamyka trzystronicowe podsumowanie, które wypunktowuje najważniejsze osiągnięcia rozprawy i do których oprócz samego pomysłu na „specjalizowane” liposomy zaliczyłbym określenie lokalizacji leku w dwuwarstwie lipidowej, które w konsekwencji pozwoliło zoptymalizować skład błony, następnie opracowanie metody oznaczania składników formulacji liposomowej z wykorzystaniem techniki HPLC i tym samym opisanie wpływu kształtu cząsteczki lipidu na wydajność zamykania disulfiramu we wnętrzu dwuwarstwy. Do sukcesu pracy zaliczam również ciągle wstępne, ale wartościowe wyniki dotyczące nanofarmaceutyku zawierającego kompleksy disulfiram - jony miedzi. Natomiast z ostatnim zdaniem w podsumowaniu, o wyznaczeniu stałych dysocjacji lek-albumina, nie zgadzam się, chyba że Doktorant mnie przekona podczas obrony.

Badania zaprezentowane w przedstawionej do recenzji pracy pokazują, że pan mgr Jan Procek zdaje sobie sprawę z możliwości bardzo wielu metod biofizycznych oraz, że potrafi je stosować, chociaż wydaje się, że w kilku przypadkach poszedł nieco za daleko z interpretacją. Prace takie mają ogromne praktyczne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów wprowadzania leków, białek lub materiału genetycznego do komórek.

Uwagi recenzenta w niewielkim stopniu obniżają wysoką oceny pracy, a mają uściślić moje wątpliwości i w większości odnoszą się do stylu pracy, której nieco zabrakło ostatniego szlif, a nie zawartości merytorycznej i często mają charakter redakcyjny lub dyskusyjny. Mam nadzieję, że pomogą doktorantowi w dalszej pracy naukowej. Pan mgr inż. Jan Procek okazał się sprawnym eksperymentatorem, który opanował technologię przygotowywania modelowych liposomów, jak również szereg zaawansowanych technik fluorescencyjnych, pracy z liniami komórkowymi i przedstawił wiarygodne wyniki, które stanowią zamkniętą całość.

Podsumowując mogę stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr inż. Jana Procka spełnia wymagania stawiane w art. 14 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

2014 r. poz. 1852 z późn. zm.), oraz stosownie do par. 6 ust. 3 i 4 rozporządzenia MNiSzW z dnia 30 października 2015 r., stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną Autora i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wroclawskiej o dopuszczenie mgr inż. Jana Procka do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

Z recenzenckiego obowiązku wymieniam drobne błędy, które nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, aczkolwiek ich ilość nieco przekracza standardy:

1. Mam wątpliwość czy użycie słowa *charakteryzacja*, zarówno w tytule rozprawy jak i w celach jest prawidłowe, lepsza byłaby *charakterystyka*.
2. Tytuł podrozdziału 5.12 – jest „*hodowli ...*” zamiast „*hodowle...*”
3. Pomieszanie nazw angielskich i polskich związków chemicznych: Tab. 2 (np. *dehydroascorbic acid*; ale *oksaliplatyna(prodrug)*, *copolimer/kopolimer* itd.
4. Spis skrótów – część nazw angielskich mimo, że mają polskie odpowiedniki.
5. Str. 2 „*disulfriam*”
6. Str. 8 „*W 2100 roku szacowany koszt byłszacowany...*”
7. Str. 14 „*reticulu endoplazmatyczne*”
8. Str. 22 „*...błony uformowana,*”
9. Str. 26 „*inhibitor kinazy 1 aktywowanych mitogenami*”
10. Str 28. – brak słowa *celów* w zdaniu „*W rozprawie przedstawiono*”
11. Str 29 – „*... wykorzystanojednegoznaczników*”
12. Str. 37 – „*Evaorative...*”
13. Str. 45 – „*Krzyw*”
14. Str. 48 – „*...proporcjonalne...*”
15. Str. 51 – „*... ligandnu..*”
16. Str. 51 – „*odpowiadają zmianą entalpii...*”



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

17. Str. 56 – „...intensywności fluorescencji posiadają niską wydajność kwantową fluorescencji....”
18. Str. 63 – „lipisomy..”
19. Str. 64 – [?] brak odnośnika
20. Str. 70 – „...zawady sferyczne... ”
21. Str. 71 – „...w przypadku **rak** wątrobowokomórkowy”
22. Str. 71 – odnośnik do str. 61 - ????
23. Str. 72 – „...wykrycie jony miedzi...
24. Str. 77 – „...stężenie albumin.. wacha się..” !!!!!
25. Str. 82/83 – błąd w numeracji; brak rysunku 66
26. Str. 89 – (rozdział 2.5) nie zawiera informacji o wpływie jonów miedzi
27. Str.90 – odwołanie do Rys. 76 dotyczy Rys. 77.
28. Dobrym zwyczajem jest pisanie określeń anglojęzycznych *italicami*.

Piotr Dobryczycki