

Gliwice, 21.06.2022 r.

Opinia o pracy doktorskiej mgr Pawła Nalepy

pt. „Wybrane nanotechnologie dla syntezy nowych terapeutyków o znaczeniu przeciwnowotworowym”.

Praca ta została wykonana w Instytucie Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, w grupie prof. Jarosława Polańskiego. Dysertacja ma standardowy układ i składa się z następujących części: założenia i cel pracy, część literaturowa, badania własne, wyniki badań, wnioski, podsumowanie i cytowana literatura.

Tematykę badań stanowią dwa osobne zagadnienia, oba ważne z punktu widzenia ewentualnych przyszłych zastosowań. Pierwsza część dotyczy syntezy i badań właściwości koniugatu fulerenu C₆₀ z gemcytabiną, natomiast w części drugiej autor skupił się na opracowaniu metody syntezy nanocząstek złota.

Część pracy dotycząca pochodnych fulerenu była finansowana w ramach projektu NCN Sonata, w którym Kandydat był wykonawcą. Plan badawczy został sformułowany w rozpoczynającym pracę rozdziale zatytułowanym „Założenia i cel pracy”, w którym autor wyjaśnia wybór gemcytabiny jako leku modelowego w skojarzonej terapii antynowotworowej oraz zastosowanie nanocząstek fulerenu C₆₀ jako nośnika tego związku.

Znane od ponad trzydziestu lat fulereny stanowią nadal przedmiot licznych badań ze względu na swoje właściwości fizyczne a także na możliwość wykorzystania ich jako nośników różnych cząstek: peptydów, oligonukleotydów, a także leków. Najlepiej opisanym przedstawicielem tej grupy alotropów węgla jest fuleren C₆₀ (FC₆₀), jednak ze względu na jego praktyczną nierozpuszczalność w większości rozpuszczalników organicznych, aby jego cząsteczki mogły być wykorzystane jako nośniki muszą być sfunkcjonalizowane. Właśnie funkcjonalizacja fulerenu C₆₀, umożliwiająca kowalencyjne przyłączenie cząsteczki leku, w tym wypadku gemcytabiny, stanowi przedmiot badań Kandydata opisanych w pierwszej części dysertacji.

Fuleren C₆₀ stanowi unikalną strukturę polienu, składającego się z 20 pierścieni heksagonalnych skondensowanych z 12 pierścieniami pięciowęglowymi, przy czym wiązania podwójne znajdują się wewnątrz pierścieni sześciowęglowych. Wiązania podwójne różnią się długością w zależności od miejsca położenia, krótsze (138 pm) w połączeniach 6,6 pomiędzy sąsiednimi pierścieniami sześciowęglowymi i dłuższe (145 pm)

w połączeniach 5,6, pentagon/heksagon. Występujące zakłócenie planarności wiązań podwójnych powoduje, że reaktywność FC60 jest podobna do elektrono-deficytowych olefin. FC60 łatwo reaguje z czynnikami nukleofilowymi i uczestniczy jako reagent dwuelektronowy w reakcjach cykloaddycji np. [4+2] i cykloaddycji 1,3-dipolarnej. Reakcje te, zachodzące z udziałem wiązania podwójnego 6,6, pozwalają wprowadzić modyfikacje w postaci pierścieni 3-, 4-, 5- i 6-cio członowych. Obecność w FC60 30 równorzędnych wiązań typu 6,6 powoduje, że nawet w przypadku zastosowania równomolowej ilości reagenta nukleofilowego, zazwyczaj oprócz produktu mono przyłączenia powstają produkty uboczne wielopodstawione. Stanowi to podstawowy problem syntetyczny, zwłaszcza w sytuacji, gdy potrzebny jest produkt o ściśle zdefiniowanej budowie nanocząstek.

Drugi obiekt badań Kandydata to nanocząstki złota (GDPs), wzbudzające duże zainteresowanie ze względu na ich wielostronne zastosowanie w nauce i technologii. Współczesne badania wskazują na możliwość zastosowania GNP's w optoelektronice jako sensory chemiczne, w nanomedycynie do transportu leków, itp. Duże nadzieje wiąże się z możliwością zastosowania izotopów złota (^{198}Au i ^{199}Au) jako składowych radiofarmaceutyków. Zwłaszcza izotop ^{198}Au wykazuje odpowiednie właściwości: czas połowicznego zaniku równy 2,7 dnia i emisja cząstek β^- penetrujących tkanki miękkie do 3,8 mm. Stężenie produktów rozpadu tego izotopu jest niższe od toksyczności chemicznej. Zatem oba kierunki badań podjęte przez Kandydata są aktualne i wpisują się w główny nurt zagadnień współczesnej chemii i nanomedycyny.

Część literaturową otwiera rozdział o terapiach nowotworowych. Rozdział ten jest napisany dość chaotycznie. Zawiera co prawda definicję nowotworu, ale dalej, ze względu na złożoność tematu, Autor zagłębia się w niepotrzebne szczegóły, które nie przybliżają problemu chorób nowotworowych i stosowanych terapii. Najbardziej trafny wydaje się podział oparty na dwóch kryteriach: typie zaatakowanej tkanki (typie nowotworu) i jego wielkości. Na tej podstawie, uwzględniając specyficzne właściwości poszczególnych typów nowotworów można przejść do poszczególnych terapii: chemioterapii, hormonalnej, immunoterapii, radiacji, terapii opartych na komórkach macierzystych, chirurgii onkologicznej czy terapii celowanej. Każda z tych terapii ma swoje podstawy wynikające z biologii molekularnej i kieruje się swoimi zasadami, które już niekoniecznie muszą być dyskutowane w tej dysertacji. Drugim ważnym zagadnieniem jest okienko terapeutyczne, w przypadku chemioterapii umożliwiające stosowanie takich stężeń leku, które dają efekt terapeutyczny przy maksymalnym bezpieczeństwie stosowania.

Kolejny rozdział to „Biologiczne działanie leków opartych na nanocząstkach”. Jest to niezmiernie ważne zagadnienie, gdyż wyjaśnia celowość poszukiwania nowych nanocząstek i ich koniugatów z substancją czynną, związaną z powierzchnią nośnika lub zamkniętej w jego wnętrzu. W rozdziale tym autor szczegółowo zagłębia się w zjawisko przenikania i retencji, które wykorzystano do wytłumaczenia preferencyjnego gromadzenia się nanocząstek wewnątrz komórek guza, ta koncepcja

w przypadku organizmu ludzkiego nadal budzi kontrowersje. Zabrakło natomiast opisu podstawowych typów transportu przez błony komórkowe, pozwalającego na zrozumienie mechanizmu dostarczania nanocząstek do wnętrza komórki. Zagadnienie to jest poruszone jakby mimochodem przy omawianiu związku pomiędzy wielkością nanocząstki a jej biodostępnością (str. 26-27). W dalszej kolejności Autor opisuje możliwości wykorzystania nanocząstek złota w medycynie. Ten rozdział napisany jest zwięźle chociaż niezrozumiałe jest dość częste nawiązywanie do nanocząstek srebra (podrozdział 2.3.1. i strona 24), które nie były stosowane w pracy. Zabrakło, w mojej opinii, zwięzłego omówienia dwóch podstawowych problemów związanych z preparatyką nanocząstek: stabilizacji rozmiaru i sposobów zapobiegania samoagregacji, mimo iż autor w swoich badaniach stosuje zabiegi pozwalające kontrolować oba te parametry. Kolejny rozdział poświęcony jest omówieniu innych nanocząstek takich jak nanorurki węglowe, grafen, kropki kwantowe i fulereny. Autor szczegółowo opisuje właściwości fulerenu C₆₀, metody jego funkcjonalizacji w celu polepszenia właściwości hydrofilowych i umożliwienia wprowadzenia grup dokujących, koniecznych do koniugacji z innymi cząsteczkami. Ta część dysertacji jest napisana w sposób umożliwiający zrozumienie przez czytelnika chemicznych właściwości tego alotropu węgla i stosowanych aktualnie metod funkcjonalizacji jego struktury.

W kolejnym rozdziale mgr Nalepa omówił zastosowanie nanocząstek w medycynie, w którym autor przedstawił dopuszczone do obrotu formułacje ułatwiające transport do biologicznego celu i kontrolowane uwalnianie leku. Większość tych form dostarczania leków bazuje na liposomach. Rozdział ten można było bez szkody dla spójności wyводу połączyć z rozdziałem następnym pt. „Prowadzone badania kliniczne pod kątem wykorzystania nanocząstek w terapii”. Jak wynika z tabeli 2 większość z aktualnie badanych preparatów dotyczy liposomów i miceli (odpowiednio 21 i 11). Podobną przewagę preparatów opartych na liposomach można zaobserwować wśród stosowanych obecnie preparatów (19 liposomowych na 32 w tabeli 1).

Duży objętościowo rozdział stanowią badania własne, w którym Kandydat opisuje wykonane prace eksperymentalne. Funkcjonalizację FC₆₀ dokonał stosując reakcję cyklopropanacji z zastosowaniem pochodnej bromomalonianu. W wyniku kilkietapowej syntezy otrzymał dwa związki finalne, różniące się rodzajem grup zwiększających hydrofilowość (malonoamid glicyny lub 2-amino-1,3-propandiolu). Jedna z pochodnych została sprzęgnięta z dwoma cząsteczkami gemcytabiny wiązaniem amidowym. Ten fragment jest napisany rozwlekle, dwa razy opisano syntezę malonamidu glicyny, w obu przypadkach otrzymuje się związek PN103, który dopiero w dalszych etapach jest różnie funkcjonalizowany. Wydajności poszczególnych etapów syntezy można uznać za zadawalające, niestety całkowita wydajność syntezy koniugatu nie przekracza 3%. Szkoda, że Autor nie podjął prób optymalizacji pierwszego etapu, syntezy malonianu diglicyny, który otrzymano zaledwie z wydajnością 20%, co znacząco wpłynęło na wydajność całkowitą PN107. Strukturę otrzymanych pochodnych FC₆₀ potwierdzono metodami spektroskopowymi, zamieszczono także odpowiednie widma. W kolejnym

etapie badań Kandydat w szeregu eksperymentów otrzymał nanocząstki złota. Zastosował klasyczny wariant syntezy polegający na redukcji kwasu chlorozłotowego w obecności gliceryny lub tanin zawartych w naparach roślinnych i poliwinylpirolidonu (PVP) jako stabilizatora nanocząstek. Doktorant zoptymalizował warunki prowadzenia eksperymentu badając wpływ stężenia prekursora (HAuCl_4), stabilizatora, stężenia zasady, kolejności dodawania reagentów i czasu reakcji na wielkość i jednorodność otrzymanych nanocząstek. Przeprowadził także trzy eksperymenty z wykorzystaniem naparów roślinnych stosując różne ilości suszu i objętości wody użytej do ich sporządzenia. Niestety nie podano nawet orientacyjnej zawartości obecnych w nich tanin, trudno zatem odnieść się do otrzymanych wyników, można wyciągnąć jedynie wnioski jakościowe. Bardziej miarodajne obserwacje można byłoby uzyskać stosując komercyjnie dostępne kwasy taninowe. Przeprowadzone eksperymenty zilustrowano rysunkami, które są mało informacyjne ze względu na zastosowanie przez Autora różnych jednostek stężenia i objętości oraz dodatkowe warianty eksperymentu. Zdaniem recenzenta wystarczające byłoby zastosowanie jednego rysunku poglądowego oddający ideę syntezy. Te same rysunki ponownie zamieszczono w części eksperymentalnej. Na str. 73 pojawiły się dwa schematy nazwane Au-3 różniące się czasem dodania reduktora. Niestety i tu zastosowano różne jednostki stężenia i objętości. W tej części Autor nie ustrzegł się od powtórzeń. W każdym eksperymencie powtarza się opis przygotowania roztworu kwasu chlorozłotowego, a zapewne stosowano ten sam przygotowany na początku roztwór podstawowy. Pomiarzy fizykochemiczne wskazują na wpływ warunków syntezy GNPs na ich poldispersyjność, potwierdziły to zarówno wyniki pomiaru potencjału Zeta jak i obrazy uzyskane z SEM. Z przeprowadzonej analizy z użyciem SEM wynika, że otrzymane GNPs różnią się kształtem i wielkością, wykazują także dużą skłonność do tworzenia agregatów. Interesujące wyniki otrzymano dla nanocząstek preparowanych w naparach roślinnych, co potwierdza dobre właściwości tanin jako związków opłaszczających (stabilizujących) nanocząstki. Zastosowanie naparu z geranium umożliwiło otrzymanie nanocząstek o średnicach poniżej 25 nm.

Kolejny, duży fragment pracy dotyczy przeprowadzonych badań biologicznych. Dla pochodnych FC60 wykonano typowe testy wstępnie filtrujące związki aktywne od nieaktywnych. Koniugat z gemcytabiną wykazuje słabe właściwości antynowotworowe w odniesieniu do panelu pięciu linii komórek nowotworowych, natomiast jego słaba toksyczność dla linii komórek zdrowych fibroblastów skóry (NHDF) z $\text{IC}_{50} > 375$ [μM] jest wynikiem pozytywnym. Wrażliwe na związek PN107 okazały się tylko komórki nowotworu piersi MCF-7 ($\text{IC}_{50} = 2,07 \pm 0,64$ μM) jednakże i w tym wypadku wynik ten jest niższy niż dla gemcytabiny ($\text{IC}_{50} = 0,044 \pm 0,008$ μM) stosowanej jako związek odniesienia. Badanie cyklu komórkowego wskazuje na słabsze hamowanie przez PN107 przejścia komórek do fazy S niż gemcytabina, która jest cytostatykiem swoistym dla fazy G1/S. Wyniki testu z

aneksyną V wskazują na indukcję apoptozy, jednakże w stopniu mniejszym niż związku referencyjnego. Dla pochodnej PN109 (nie zawierającej gemcytabiny) wykonano testy związane z wpływem tego związku na stan fizjologiczny komórek zielenic. Nie stwierdzono istotnego wpływu tego związku na parametry fizjologiczne tych komórek.

Z obowiązku recenzenta jestem zobowiązany do zwrócenia uwagi na pewne nieścisłości, które wkradły się w tekst rozprawy.

Omawiając cyklopropanację Bingla na str. 38 Autor pisze: „Przyłączana do fulerenu cząsteczka musi zawierać dwa bardzo kwaśne wodory przy tym samym atomie węgla. Czy wodory grupy metylenowej w malonianie dietylu ($pK_a = 13$) są bardzo kwaśne? Podobnie na str.39 Kandydat pisze o NaH jako silnej zasadzie i DBU jako o jeszcze silniejszej, czy tak jest rzeczywiście? Prosiłbym o komentarz w tej kwestii.

Brakuje temperatur topnienia dla związków PN101 i PN102.

Osobny problem to stosowana numeracja, która rozpoczyna się od numeru 101, jakie związki miały numery od 1 do 100?

Czytając fragment pracy dotyczący preparatyki związku PN102, nasuwa się pytanie, dlaczego Autor nie zastosował glicynianu metylu, zamiast wolnej glicyny, co skróciłoby syntezę o jeden etap (estryfikacji PN101). Nukleofilowość (zasadowość) wolnej grupy 2-amino aminokwasu jest zbliżona do alifatycznej aminy pierwszorzędowej ($pK_a = 9.60$ dla glicyny).

Autor zastosował dość nietypowy sposób rozszczepienia estru etylowego we fragmencie glicynowym PN105, PN108 ($\text{NaH} + \text{MeOH}$), czy można wyjaśnić przebieg tej reakcji? Estry są bardzo trwałe w warunkach hydrogenolizy. Rozszczepienie wiązania estrowego wymaga obecności katalizatora np. $\text{Ru}(\text{acac})_3$ i ciśnienia, zazwyczaj prowadzi do zredukowania grupy karbonylowej do hydroksylowej. Czy były próby rozszczepienia w warunkach kwasowych?

Dlaczego nie zastosowano wyższego stopnia „załadowania” gemcytabiny na cząsteczkę fulerenu. Otrzymany koniugat zawiera ok. 20% substancji czynnej.

Podsumowanie

Recenzowana praca doktorska mgr P. Nalepy stanowi interesujący przykład badań interdyscyplinarnych. Kandydat opracował syntezę pochodnych fulerenu C60, zdolnych do dokowania substancji bioaktywnej. Otrzymał taki koniugat z gemcytabiną. Zoptymalizował warunki syntezy nanocząstek złota, wykorzystując jako reduktor glicerynę. Stosując różne techniki pomiarowe udowodnił związek pomiędzy warunkami syntezy nanocząstek złota a ich wielkością i polidispersyjnością. Wykazał się bardzo dobrą znajomością różnych technik spektroskopowych, a sformułowane na podstawie otrzymanych danych eksperymentalnych wnioski są poprawne. Doskonale wykorzystał dostępne techniki oczyszczania otrzymanych pochodnych fulerenu C60. Druga

część badań to bardzo rozległe eksperymenty biologiczne. Kandydat wykazał się dużą pomysłowością poszukując możliwych zastosowań dla zsyntezowanych pochodnych. Nie ograniczył się do komórek modelowych nowotworów, ale próbował także badać wpływ pochodnych FC60 na cykl życiowy jednokomórkowych zielenic. Świadczy to o niewątpliwie szerokiej wiedzy i zainteresowaniach Pana Pawła Nalepy. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów, zarówno syntezy nanocząstek jak i doświadczeń na komórkach nowotworowych są bogato udokumentowane adekwatnymi zdjęciami lub wykresami. Rezultaty dotychczasowych badań zostały opublikowane w trzech pracach naukowych.

Na podstawie rozprawy doktorskiej, opublikowanych prac naukowych mogę z pełnym przekonaniem stwierdzić, że Kandydat spełnia wymogi stawiane kandydatom do stopnia doktora przewidziane ustawą z dn. 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i składam wniosek do Rady Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego o dopuszczenie mgr Pawła Nalepy do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk chemicznych.

