

Hanna Radecka
Profesor emerytowany dr hab.
Pracownia Bioelektroanalizy
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
Tuwima 10
10-748 Olsztyn

Olsztyn. 19.07.2021

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani Mgr. Agaty Krzak pt.:
„Modyfikowane cyklodekstryny jako nośniki leków i ich oddziaływania z DNA”
wykonanej w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrood na Wydziale Chemii Uniwersytetu
Warszawskiego
pod kierunkiem prof. Dr hab. Renaty Bilewicz

Prezentowana rozprawa doktorska Pani mgr. Agaty Krzak wpisuje się w nurt bardzo nowoczesnych i aktualnych badań dotyczących opracowania nośników leków umożliwiających ich precyzyjny transport do miejsc zaatakowanych chorobą z pominięciem zdrowych obszarów. Taka strategia zwiększa skuteczność leczenia z jednoczesnym zmniejszeniem skutków ubocznych.

Autorka rozprawy zastosowała pochodne cyklodekstryn w roli potencjalnych nośników leków.

Modyfikacje cyklodekstryn zostały starannie zaplanowane w celu sprawdzenia wpływu wybranego podstawnika na określone parametry potencjalnego nośnika takie jak: zwiększenie stałych trwałości kompleksów z wybranymi lekami, zapewnienie powinowactwa do receptorów występujących na powierzchni błon komórek nowotworowych, wykreowanie zależności stałych trwałości kompleksów lek- cyklodekstryna od wartości pH. Wymienione parametry mają decydujący wpływ na skuteczne i celowane dostarczenie leku.

Autorka włączyła w swoją rozprawę badania dotyczące oddziaływania leków przeciw nowotworowych antracyklin z dsDNA w obecności wybranych cyklodekstryn.

Rozprawę doktorską rozpoczyna jej streszczenie. Autorka zdecydowała się na skrótowy opis poszczególnych rozdziałów. Uważam, że syntetyczne podsumowanie uzyskanych wyników, z podkreśleniem najważniejszych osiągnięć, zdecydowanie podniosłoby walory poznawcze streszczenia, zachęcając do zapoznania się z całą rozprawą. W opisie celu rozprawy, zbrakło podkreślenia nowości podejmowanych zadań badawczych w świetle badań już przeprowadzonych przez inne ośrodki naukowe, włączając Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Rozprawa Pani mgr. Agaty Krzak zwiera bogatą część literaturową, podzieloną na cztery rozdziały i szereg podrozdziałów. Autorka szczegółowo opisuje cyklodekstryny, ich budowę oraz właściwości (rozdział 1). Następnie przedstawia kwas deokserybonukleinowy, ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływań ze związkami chemicznymi spełniającymi rolę leków (rozdział 2). Kolejne rozdziały są poświęcone opisowi leku temozolomidu (rozdział 3) oraz pochodnych antrachinonu (rozdział 4).

Część literaturowa jest odpowiednio nasycona licznymi (152 pozycje) i adekwatnymi odnośnikami literaturowymi. Autorka przedstawia szereg metod otrzymywania kompleksów cyklodekstryn z lekami. Chciałabym zapytać, jaki procent leku występuje w postaci kompleksu z cyklodekstryną w zależności od metody otrzymywania kompleksu? W rozdziale 1.5.5 (strona 32), autorka umieściła informacje, że (cytuję) „...cyklodekstryny nie są zdolne do szybkiego przenikania przez błony biologiczne. Wolna postać leku, niezwiązana z kompleksem i będąca w równowadze z kompleksem lek-CD, ma tendencję do penetracji błon lipofilowych [18]”. Chciałabym autorkę zaprosić do głębszego przedyskutowania tego problemu. Czego możemy się spodziewać stosując cyklodekstryny do celowego transportu leków? Jak należy dobierać typ kompleksu lek- cyklodekstryna w celu uzyskania najlepszego efektu terapeutycznego? Jakie czynniki powodują uwalnianie leku z kompleksu lek- cyklodekstryna?

Autorka umieszcza informację w rozdziale 4.4 (strona 66), że, cytuję „Cyklodekstryny są w stanie zmniejszać ilość cholesterolu w błonach komórkowych.” Jaki jest mechanizm tego istotnego procesu?

Rozdział 4.4 jest ostatnim rozdziałem Części literaturowej. Kończy się nagle. Odczuwa się brak podsumowania tego rozdziału, uzasadniającego celowość podjętych badań.

Część eksperymentalna jest przedstawiona bardzo starannie i klarownie. Świadczy to, że autorka bardzo dobrze zna podstawy metod stosowanych do realizacji rozprawy.

Autorka dziękuje Panu dr Maciejowi Majdeckiemu za syntezę modyfikowanych cyklodekstryn (strona 2 rozprawy). Uważam jednak, że należało umieścić tą informację również w rozprawie, np. na stronie 85, za fragmentem opisującym nowo zsyntetyzowane pochodne beta- cyklodekstryny.

Nasuwa się również pytanie, czy autorka rozprawy brała udział w planowaniu syntezy nowych pochodnych cyklodekstryn?

W punkcie 6 Części eksperymentalnej autorka umieszcza informacje o aparaturze i odczynnikach.

Następnie, w punkcie 7 przedstawia wyniki dotyczące wyznaczania rozpuszczalności pochodnych cyklodekstryn. Moim zdaniem, w tym miejscu należało rozpocząć nowy rozdział dotyczący omawiania uzyskanych przez autorkę wyników.

Do realizacji rozprawy autorka zastosowała natywną beta cyklodekstrynę oraz cztery jej pochodne różniące się podstawnikami. Ich wzory strukturalne zostały przedstawione w Tabeli 2. Zastosowane podstawniki miały wpływ na rozpuszczalność cyklodekstryn. Wysoka rozpuszczalność cyklodekstryn jest zwłaszcza pożądana w pH 5,5 charakteryzującym miejsca zmienione nowotworowo.

Do badania kompleksów z pochodnymi cyklodekstryn autorka wybrała następujące leki: temozolomid, kwas antrachino-2-karboksylowy, sól sodową kwasu antrachino-2- sulfonowego, doksorubicynę oraz daunorubicynę.

Wykorzystując właściwości elektrochemiczne temozolomidu, autorka wyznaczyła wartości stałych trwałości jego kompleksów z pochodnymi cyklodekstryn stosując woltamperometrię cykliczną i woltamperometrię pulsową różnicową, uzyskując bardzo podobne wartości (Tabela 5). Zdecydowanie niższe wartości stałych trwałości kompleksów temozolomidu z beta-cyklodekstrynami posiadającymi

podstawnik triazolowy oraz galaktozaminę zarejestrowane w pH 5,5 w porównaniu z pH 7,4 wskazują na potencjalną użyteczność tych pochodnych do celowego transportu temozolomidu.

W przypadku kwasu antrachino-2-karboksylowego, do wyznaczania wartości stałych trwałości jego kompleksów z pochodnymi cyklodekstryn autorka zastosowała spektroskopię UV-Vis. W przypadku tego związku, do pomiarów wartości stałych trwałości zastosowano pH 7,4 oraz pH 3,0. Dlaczego?

Dane przedstawione w Tabeli 6 wskazują za zdecydowanie wyższe wartości stałych trwałości zarejestrowane w roztworach o pH 3,0 w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla roztworów o pH 7,4. Dlaczego?

Wykorzystując obecność elektro-aktywnej grupy chinonowej w strukturze kwasu antrachino-2-karboksylowego oraz soli sodowej kwasu antrachino-2- sulfonowego, autorka wyznaczyła wartości stałych trwałości ich kompleksów z pochodnymi cyklodekstryn stosując woltamperometrię cykliczną (Tabela 7). Uzyskane wartości są zbliżone do wartości uzyskanych metodą UV-Vis. Zdecydowanie wyższe wartości stałych trwałości zarejestrowano w roztworach o pH 3,0 w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla roztworów o pH 7,4.

Na stronie 124 autorka umieszcza informację, że doksorubicyna oraz daunorubicynę ulegają reakcjom utlenienia i redukcji z udziałem dwóch elektronów oraz dwóch protonów. Niestety, autorka nie umieściła w rozprawie eksperymentalnego udowodnienia tego stwierdzenia.

Wartości stałych trwałości kompleksów doksorubicyny oraz daunorubicyny z pochodnymi cyklodekstryn zostały wyznaczone metodą woltamperometrii fali prostokątnej. Uzyskane wyniki zebrano w Tabeli 8. W jej podpisie jest brak metody wyznaczania. W przypadku tych kompleksów zarejestrowano wyższe wartości stałych trwałości w roztworach o pH 7,4 w porównaniu z wartościami uzyskanymi w roztworach o pH 5,5.

Autorka do rozprawy włączyła również wyniki dotyczące możliwych oddziaływań pomiędzy cząsteczką doksorubicyny a beta – cyklodekstryną z łącznikiem triazolowy i kwasem liponowym oraz beta – cyklodekstryną z łącznikiem triazolowym i galaktozaminą uzyskane poprzez przeprowadzenie symulacji komputerowych. Symulacje zostały wykonane przez dr Olgę Świech z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w renomowanych czasopismach *Nanoscale* 8, 2016, 16733-16742 oraz *Inter. J. of Pharm.* 589, 2020, 119834-119847. Pani mgr. Agata Krzak jest współautorką obu artykułów. Niestety, nie określiła swojego udziału. Na podstawie uzyskanych obliczeń stwierdzono, że w pH 5,5 kompleks samoinkluzyjny między pierścieniem 1,2 - ditiolanu a wnęką beta – cyklodekstryny z łącznikiem triazolowym i kwasem liponowym jest preferowaną formą cząsteczki. Natomiast w pH 7,4 zaobserwowano swobodne ruchy termiczne łańcucha bocznego cyklodekstryny, z niewielkim udziałem kompleksu samoinkluzyjnego. W obecności doksorubicyny stwierdzono, że w pH 7,4 wnika ona do wnęki cyklodekstryny tworząc kompleks inkluzyjny. Natomiast w pH 5,5 dochodzi do powstawania kompleksu samoinkluzyjnego z kwasem liponowym we wnęce. Cząsteczka doksorubicyny znajduje się poza wnęką, oddziaływując z łącznikiem triazolowym i kwasem liponowym obecnym w cząsteczce beta – cyklodekstryny poprzez wiązania wodorowe oraz oddziaływania protonowo-akceptorowe. Natomiast w przypadku beta – cyklodekstryny z łącznikiem triazolowym i galaktozaminą wykazano, że najbardziej korzystne energetycznie jest położenie łańcucha bocznego zawierającego galaktozaminę poza wnęką cyklodekstryny, a doksorubicyna znajduje się wewnątrz wnęki. Dodatkowo stwierdzono, że pierścień triazolowy wzmacnia kompleks poprzez oddziaływania protonowo- akceptorowe z pierścieniem aromatycznym leku. Chciałabym poprosić autorkę o przedyskutowanie wniosków uzyskanych przy

pomocy symulacji komputerowych, a wynikami uzyskanymi przy pomocy metod elektrochemicznych oraz spektroskopii UV-Vis.

Do zbadania cytotoksyczności wybrano beta – cyklodekstrynę z łącznikiem triazolowym i kwasem liponowym oraz jej kompleks z doksorubicyną. Badania zostały wykonane przez grupę prof. Marcina Kruszewskiego w Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej. Badania przeprowadzono na komórkach ludzkiego raka płuc oraz raka szyjki macicy. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Nanoscale* 8, 2016, 16733-16742.

Natomiast do zbadania cytotoksyczności w stosunku do komórek ludzkiego raka wątrobowo komórkowego wybrano beta – cyklodekstrynę z łącznikiem triazolowym i galaktozaminą oraz jej kompleks z doksorubicyną. Badania zostały przeprowadzone przez dr Alicję Trębińską – Stryjowską z Centrum Inżynierii Biomedycznej Instytutu Optoelektroniki Wojskowej Akademii Technicznej oraz mgr Macieja Wakulę z Zakładu Onkologii Molekularnej i Translacyjnej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie. Wykazano, że beta – cyklodekstryna z łącznikiem triazolowym i galaktozaminą nie była toksyczna dla komórek, natomiast doksorubicyna oraz kompleks doksorubicyny z beta – cyklodekstryną z łącznikiem triazolowym i galaktozaminą zmniejszały aktywność metaboliczną komórek w sposób zależny od stężenia i czasu w podobnym stopniu.

Uzyskane w wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Inter. J. of Pharm.* 589, 2020, 119834-119847. I obu przypadkach, udział Pani mgr. Agaty Krzak nie został określony.

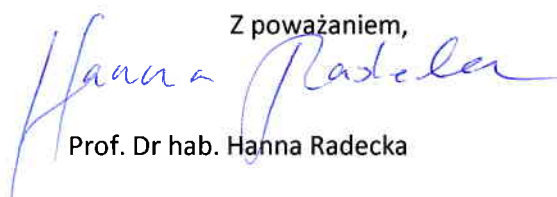
Przedmiotem badań Pani mgr. Agaty Krzak był również wpływ pochodnych cyklodekstryn na oddziaływanie doksorubicyny oraz daunorubicyny z dsDNA. Badania przeprowadzono metodą UV-Vis. Wartości stałych wiązania kompleksów zestawiono w Tabeli 9. W przypadku oddziaływań kompleksu doksorubicyny oraz daunorubicyny z beta – cyklodekstryną z łącznikiem triazolowym i galaktozaminą otrzymano wyższą wartość stałej wiązania w pH 5, 5 w porównaniu z wartościami otrzymanymi w pH 7, 4. Dla kompleksów z pozostałymi pochodnymi cyklodekstryny zaobserwowano zależność odwrotną. Dlaczego?

Pani mgr. Agata Krzak jest współautorką 6 pozycji literaturowych. Ale tylko dwie z nich (*Nanoscale* 8, 2016, 16733-16742; *Inter. J. of Pharm.* 589, 2020, 119834-119847) umieściła w rozprawie doktorskiej. W dwóch artykułach opublikowanych w renomowanych czasopismach (*Electrochimica Acta*, 247, 2017, 139-148 oraz *Bioelektrochemistry*, 136, 2020, 107587-107593) Pani mgr. Agata Krzak jest pierwszą autorką. Wyniki opisane w tych artykułach moim zdaniem stanowią jej kluczowe osiągnięcia.

Podsumowując, stwierdzam, że wyniki uzyskane przez Panią mgr. Agatę Krzak stanowią istotny wkład w poszukiwaniu związków spełniających rolę nośników leków zwiększających efektywność leczenia, a jednocześnie zmniejszających działania uboczne. Jednocześnie, potwierdzają wysoką przydatność metod elektrochemicznych do realizacji tego typu badań.

Zatem, zwracam się do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o kontynuowanie procedury związanej z obroną rozprawy doktorskiej Pani mgr. Agaty Krzak.

Z poważaniem,



Prof. Dr hab. Hanna Radecka