



Poznań, 02.12.2021 r.

Dr hab. Radosław Mrówczyński, prof. UAM
Wydział Chemii UAM
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej **mgr Kamili Agnieszki Butowskiej**
pt.: ” Wybrane koniugaty doksorubicyny jako potencjalne układy w terapii
przeciwnowotworowej”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Jacka Piosika, prof. UG oraz prof. dr hab. Janusza Raka
na zlecenie Dziekana Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed

Podstawa prawna: art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym
oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi
zmianami)

1. TEMATYKA

Prace badawcze podjęte przez Panią Kamilę Butowską należy zakwalifikować do obszaru nanomedycyny której jednym z najprężniej rozwijających się obszarów jest synteza nośników leków w skali nanometrycznej. Szczególnie duże zainteresowanie nanomedycyną obserwuje się w ostatniej dekadzie. Badania z tego zakresu prowadzone są w najlepszych ośrodkach na świecie m.in. na MIT, University of Oxford czy KAIST oraz jak widać z powodzeniem na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG i GUMed. Dzięki unikatowym właściwościom, zależnym od typu materiału wykorzystanego do ich syntezy, nowoczesne nanoplatformy poprawiają rozpuszczalność leków hydrofobowych, mogą służyć jako związki kontrastujące w magnetycznym rezonansie jądrowym lub odczynniki fototermiczne. Polem, na którym najczęściej wykorzystuje się tego typu układy jest onkologia, gdzie nanonośniki służą do transportu leków cytostatycznych, a coraz częściej służą do prowadzenia skojarzonych terapii przeciwnowotworowych np. łączonej chemio-

i fototerapii czy chemio- i genoterapii. Stosując dotychczas wypracowane metody funkcjonalizacji nanomateriałów możliwe jest uzyskanie nanomateriałów aktywnie celujących do komórek nowotworowych, co znacznie zwiększa potencjał ich aplikacji. Ważnym aspektem prac nad nowymi nośnikami jest opracowanie metod nanoszenia leku cytostaticznego na powierzchnię nośnika lub opracowanie metod pozwalających na jego wprowadzenie do wnętrza. Kolejnym istotnym punktem w pracach nad zaawansowanymi nanonośnikami leków cytostaticznych jest kontrolowane uwalnianie leku pod wpływem zewnętrznego bodźca w miejscu docelowym, zmieniony chorobowo. Badania w zakresie nanomedycyny są badanymi interdyscyplinarnymi i prowadzone są na styku biologii (biologia molekularna i biotechnologia), chemii (chemia koloidów, chemia polimerów, chemia biomolekuł, synteza chemiczna) a także fizyki, medycyny i inżynierii materiałowej. Takie prace wymagają szerokiej wiedzy od pomysłodawcy i koordynatora badań praktycznie w każdym przytoczonym zakresie, a także umiejętności współpracy ze specjalistami z poszczególnych obszarów. W związku z powyższym stwierdzam, że tematyka badawcza Doktorantki przedstawiana w jej dysertacji dotycząca opracowania nowych nośników doksorubicyny dla terapii przeciwnowotworowej jest aktualna i wpisuje się w trendy nowoczesnych badań w zakresie Nauk Chemicznych i Biologicznych.

2. STRUKTURA, ZAKRES I CEL ROZPRAWY

Podstawę oceny recenzowanej pracy doktorskiej, według załączonej dokumentacji, ma stanowić cykl 5 spójnych tematycznie publikacji wyszczególnionych poniżej.

- [P1] K. Butowska, W. Kozak, M. Zdrowowicz, S. Makurat, M. Rychłowski, A. Hać, A. Herman-Antosiewicz, J. Piosik, J. Rak "Cytotoxicity of doxorubicin conjugated with C60 fullerene .Structural and in vitro studies" Structural Chemistry, 2019, 30, 2327–2338.
- [P2] K. Butowska, K. Żamojć, M. Kogut, W. Kozak, D. Wyrzykowski, W. Wiczek, J. Czub, J. Piosik, J. Rak "The product of matrix metalloproteinase cleavage of

Doxorubicin conjugate for anticancer drug delivery: calorimetric, spectroscopic, and molecular dynamic studies on peptide-doxorubicin binding to DNA” International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21, 6923.

• [P3] K. Butowska, W. Kozak, M. Kogut, Z. Pietralik-Molińska, A. Moliński, K. Kitowska, M. Kozak, J. Czub, R. Sądej, J. Rak, J. Piosik „MMPs-sensitive release of doxorubicin as a strategy for cancer targeted therap” Materials, 2021

• [P4] K. Butowska, X. Han, N. Gong, R. El-Mayta, R. M. Haley, W. Zhong, W. Guo, M.J.Mitchell “Doxorubicin-conjugated siRNA lipid nanoparticles for combination cancer therapy. Acta Pharmacologica Sinica B, 2021

Publikacje przeglądowe:

• [P5] JK. Butowska, A. Woziwodzka, A. Borowik, J. Piosik “Polymeric nanocarriers : a transformation in doxorubicin therapies” Materials, 2021, 14, 2135.

Oryginalne prace Doktorantki P1 i P2 przeszły proces recenzji i zostały opublikowane na łamach recenzowanych międzynarodowych czasopism. Ta sama sytuacja dotyczy artykułu przeglądowego P5. Natomiast pewne kontrowersje może budzić fakt, że prace P3 i P4 będące integralną częścią cyklu nie zostały opublikowane i są nadal w recenzji. Kopie prac P3 i P4 zostały dołączone do rozprawy i w mojej opinii wyniki badań przedstawione w tych artykułach ukażą się w najbliższym czasie drukiem. Nie mniej jednak uważam, że w takiej sytuacji sposób przedstawiania dysertacji w formie cyklu publikacyjnego nie jest do końca trafiony.

Przewodnik po publikacjach jest przygotowany z należytą starannością, napisany jest w języku polskim bez rzucających się w oczy błędów pisarskich i gramatycznych. Na początku Autorka zamieściła listę publikacji stanowiących jej osiągnięcie naukowe a także wyszczególniła swój udział na konferencjach. W kolejnych rozdziałach przedstawiła streszczenie pracy zarówno w języku polskim jak i angielskim oraz opisuj cel badań. W kolejnych rozdziałach mgr Butowska przedstawiła przegląd literatury i badania własne. Rozdział IV i V to odpowiednio podsumowanie i piśmiennictwo. Całość zakończona jest wykazem rysunków i tabel, kopiami publikacji oraz oświadczeniami współautorów.

Prace Doktorantki są wieloautorskie, co wynika z interdyscyplinarnego charakteru przeprowadzonych prac badawczych. We wszystkich artykułach Doktorantka jest pierwszym autorem a dodatkowo raz głównym autorem korespondencyjnym i raz drugim autorem korespondencyjnym. Artykuły zostały opublikowane, bądź wg zamierzeń Autorki będą opublikowane w czasopismach o wysokim współczynniku wpływu pomiędzy 1.8 a 11 (czego gorąco życzę). Dołączone do pracy oświadczenia współautorów jednoznacznie wskazują na wiodącą rolę Doktorantki w prowadzonych badaniach i powstałych na ich bazie publikacji. Należy podkreślić aktywność naukową Doktorantki, która w mojej ocenie jest ponadprzeciętna. Pani mgr Butowska jest współautorką aż 13 publikacji (bądź wkrótce będzie), rozdziału w monografii i ponad 20 wystąpień na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Doktorantka jest także laureatką programu im. Wilhelminy Iwanowskiej z Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej dzięki, któremu odbyła staż naukowy na Wydziale Inżynierii Uniwersytetu w Pensylwanii, co niewątpliwie zaowocowało podniesieniem poziomu przeprowadzonych badań a tym samym całej rozprawy doktorskiej. Dlatego dziwi fakt, że przy tak dużej aktywności mgr Butowskiej część literaturowa pracy ma zaledwie 10 stron a przedstawianie wyników badań to tylko 17 stron. Moim zdaniem szersze przedstawienie zagadnienia nanonośników i omówienia chociażby kilku klas nanomateriałów, sposobów dostarczania doksorubicyny pozwoliłoby na lepsze umiejscowienie, otrzymanych przez Doktorantkę, wyników w świetle doniesień literaturowych i stanowiłby źródło wiedzy dla osób wchodzących w temat dostarczania leków. Co więcej, czytelnikowi pracy doktorskiej pozwoliłoby to na lepsze zrozumienie dokonań Doktorantki. Oczywiście nie chodzi o całkowite przepisanie artykułu przeglądowego P5 a jedynie o wskazanie tła naukowego prowadzonych badań własnych. W tej części brakuje także pełniejszego omówienia strategii celowania leków do komórek nowotworowych oraz terapii przeciwnowotworowych. Pani mgr Butowska w swojej rozprawie dość pobieżnie przedstawia strategię uwalniania leków oraz zjawisko interferencji RNA. Taki termin w ogóle nie zostaje użyty choć mgr Butowska korzysta z tej metody w pracy P4. Ponadto Autorka „oszczędnie” dyskutuje otrzymane wyniki. Oczywiście 3 z 5 przedstawionych prac przeszły już proces recenzji a dyskusja wyników w tych artykułach jest bardzo wartościowa lecz dwa

artykuły są w recenzji i należałoby na potrzeby dysertacji rozszerzyć dyskusję otrzymanych wyników.

Cel pracy sformułowany przez Doktorantkę jest poprawny, ale jednocześnie szeroki i „bezpieczny” dlatego brakuje w nim szczegółowych założeń projektowych. Przeprowadzone badania miały charakter interdyscyplinarny obejmowały projektowanie eksperymentów, syntezę koniugatów oraz nanomateriałów, charakterystykę otrzymanych związków i materiałów z zastosowaniem takich metod jak DLS, AFM, TEM, spektroskopia UV-Vis, spektrometrii mas, NMR, testy cytotoksyczności, badania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej oraz obliczeń molekularnych.

Prace doktorantki zostały już zrecenzowane albo podlegają ocenie, dlatego ograniczę się tylko do krótkiego przedstawienia ich treści. W pracy P1 Doktorantka przeprowadziła funkcjonalizację fulerenu C_{60} pochodną malonianu, która następnie została wykorzystana do kowalencyjnego związania doksorubicyny. Niestety materiał ten był nieskuteczny w zwalczaniu komórek nowotworowych, co pokazano na kilku liniach komórkowych stosując testy WST i SRB. Ten stan rzeczy został przypisany tworzeniu się agregatów, które były większe niż pory w jądrze komórkowym przez co chemioterapeutyk nie został dostarczony do jądra komórkowe i nie interkalował do DNA. Takie wnioski wysnuto m.in. na podstawie obserwacji zdjęć z mikroskopii konfokalnej. W pracy P2 Doktorantka podjęła próby syntezy konigatu PEG-8-pep-DOX, który scharakteryzowała kilkoma technikami ze szczególnym uwzględnieniem AFM czy spektroskopii UV-Vis. W tej pracy Pani mgr Butowska szczegółowo przedstawiła mechanizm łączenia się produktu przejściowego, powstałego w wyniku hydrolizy 8-pep licyna₁-prolina₂-leucyna₃-glicyna₄-leucyna₅-alanina₆-glicyna₇-glicyna₈ w obecności metaloproteinaz, opisanego jako 4-pep z DNA. W tym celu posłużyła się spektroskopią UV-VIS, spektrofotometrią oraz skorzystała z izotermicznej kalorymetrii miareczkowej. Dane otrzymane podczas prac nad uwalnianiem leku w obecności metaloproteinaz pozwoliły na zaprojektowanie eksperymentów biologicznych z wykorzystaniem PEG-8-pep-DOX, które jak wcześniej pokazano tworzyły fibryle na skutek oddziaływań pomiędzy DOX a fragmentem peptydowym z DOX. Badania aktywności

przeciwnowotworowej w warunkach *in vitro* przeprowadzono na kilku liniach komórkowych m.in. HT-1080, MDA-MB-436 oraz MCF-7.

W ostatniej części dotyczącej wyników badań własnych Doktorantka przedstawiła syntezę lipidowych nanocząstek pozwalających na jednoczesne dostarczanie siRNA oraz DOX w celu zahamowania wzrostu guza w modelu mysim chłoniaka Burkitt'a. Praca P5 to artykuł przeglądowy poruszający zagadnienie wykorzystania nanoosińników na bazie polimerów do dostarczania DOX.

W trakcie oceny rozprawy nasuwają się pewne pytania i komentarze, które mam nadzieję zostaną przedyskutowane podczas obrony pani mgr Butowskiej.

1. Dlaczego Doktorantka zdecydowała się na wykorzystanie fulerenu C₆₀?
2. Dlaczego wykorzystano DBU jako zasadę w reakcji sprzężenia fulerenu z bromopochodną kwasu malonowego?
3. Jakimi metodami potwierdzono kolejne kroki funkcjonalizacji nanoosińników w pracach P1 oraz P4? Co mogłyby wnieść badania w podczerwieni?
4. Jak można by zapobiec agregacji nośnika na bazie fulerenu, aby skutecznie dostarczać doksorubicynę?
5. Jak inaczej można zastosować strategię uwalniania leków z wykorzystaniem metaloproteinaz w kontekście uzyskanych wyników? Czy są plany na dalsze badania w tym temacie?
6. W opisie wyników dotyczącym nanoosińnika na bazie cząstek lipidowych padają stwierdzenia że "... profil uwalniania DOX z LNP2-DOX zależał od wartości pH buforu w którym się znajdował badany nośnik (Rys. 18D oraz Rys. 3D w P4). Wyniki eksperymentu dla pH 5.1 wskazały, że 80% DOX zostało uwolnione z nośnika już po 8 godzinach inkubacji, natomiast w przypadku pH fizjologicznego było to jedynie 40%." Proszę wytłumaczyć różnicę w uwalnianiu leków w zależności o pH oraz przedyskutować 40% uwalnianie się leku w warunkach fizjologicznych. Czy to dużo czy mało?
7. Proszę o pełniejsze wyjaśnienie zjawiska promowania wzrostu komórek MCF-7 podczas inkubacji z PEG-8-pep-DOX.

8. Proszę o podanie właściwości nanocząstek lipidowych, które zdaniem Doktorantki są pożądane i przyczyniają się do wychwytu komórkowego i dła czegolipidowe nanocząstki to „idealne systemy do dostarczania leków”.

3. OCENA MERYTORYCZNA

Stwierdzam, że opiniowana rozprawa doktorska posiada wiele aspektów poznawczych i stanowi oryginalny wkład Autorki w rozwój strategii dostarczania koniugatów doksorubicyny dla terapii przeciwnowotworowej. Cel badawczy zostały zrealizowany, a wyniki badań opublikowano w renomowanych czasopismach naukowych z danej dziedziny. Wszystkie osiągnięcia naukowe mgr Kamili Butowskiej są imponujące i dobrze rokują na dalszy rozwój kariery Doktorantki. Aktywność na wszystkich polach związanych z nauką jest wyróżniająca, gratuluję Pani mgr Butowskiej oraz Panom Promotorom tak ambitnej Doktorantki.

4. WNIOSKI

Biorąc pod uwagę powyższe fakty stwierdzam jednoznacznie, że przygotowana przez Panią mgr Kamilę Agnieszkę Butowską rozprawa pt.: „Wybrane koniugaty doksorubicyny jako potencjalne układy w terapii przeciwnowotworowej” spełnia wszystkie kryteria stawiane pracom doktorskim, wymienione w Ustawie z dnia 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora, z dnia 26 września 2016 r. Dlatego też kieruję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed wniosek o dopuszczenie Autorki do kolejnych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

