

Prof. dr hab. Irena Staneczko – Baranowska

Gliwice 19.05.2020

Katedra Chemii Nieorganicznej, Analitycznej i Elektrochemii

Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska

Gliwice

OCENA

**rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry CZESZAK pt. WYBRANE ALKALOIDY
IZOCHINOLINOWE - CHARAKTERYSTYKA I POTENCJALNE ZASTOSOWANIE**

FARMAKOLOGICZNE, wykonanej pod kierunkiem

Pani prof. dr hab. IZABELI NOWAK i promotora pomocniczego

Pani dr MATYLDY RESZTAK

Przedstawiona do oceny praca dotyczy szerokich badań właściwości fizykochemicznych i oznaczania czterech alkaloidów izochinolinowych – chelidoniny i allokryptopiny w formie wolnej oraz chelerytryny i sangwinaryny w formie chlorowodorków. Ponadto obejmuje prace nad otrzymywaniem nanocząstek lipidowych, inkorporowanych tymi związkami i próby ich farmakologicznego zastosowania.

Podjęta przez mgr Aleksandrę Czeszak tematyka wpisuje się w aktualny nurt badań, szczególnie tych, w których kładzie się duży nacisk na poszukiwanie nowych form nośników leków. Podawanie farmaceutyków w formie umożliwiającej kontrolowanie szybkości uwalniania i zwiększenie trwałości leku niesie wiele korzyści, szczególnie w terapii celowanej. Wybór odpowiedniego, biokompatybilnego i biodegradowalnego nośnika, enkapsulacja z zachowaniem stabilności leków, a przy tym wydajne i niskie koszty produkcji stanowią duże wyzwania badawcze. Szkoda, że w tytule pracy nie wyeksponowano wyraźniej tej szczególnie ciekawej części doktoratu. Uważam, że celowość podjętego tematu badań jest w pełni uzasadniona i ważna zarówno z poznawczego i praktycznego punktu widzenia.

Przysłana mi do oceny praca stanowi klasycznie napisaną dysertację liczącą 152 strony, podzieloną na następujące części: wstęp, przegląd literatury, cel pracy, metodyka pracy, wyniki

badań i dyskusja, podsumowanie i wnioski, streszczenie, literatura. Na podkreślenie zasługuje obszerna bibliografia, obejmująca 247 pozycji, w większości oryginalnych i aktualnych publikacji. Przydatnym okazał się zamieszczony wykaz skrótów, ułatwiający lekturę tej rozprawy.

W części literaturowej, zamieszczonej na 24 stronach opisano występowanie i niektóre właściwości fizykochemiczne badanych alkaloidów, techniki ekstrakcji i metody analityczne stosowane do ich oznaczania. Kolejno opisano właściwości stałych nanocząstek lipidowych (SLN), metody ich otrzymywania oraz metody najczęściej stosowane do ich charakterystyki. Ta część rozprawy jest merytorycznie na dobrym poziomie, chociaż wyraźnie niedosyt budzi zbyt lakoniczny, zaledwie na pół strony, opis dotyczący zastosowania SLN w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym. Jest to szczególnie ważne, gdyż bardzo ciekawa część rozprawy właśnie poświęcona jest enkapsułowaniu badanych alkaloidów i ocenie aktywności cytotoksycznej inkorporowanych nimi nanocząstek.

Cel i główne założenia rozprawy zostały jasno sformułowane, zwraca przy tym uwagę szerokie spektrum zaplanowanych badań.

W rozdziale zatytułowanym **Metodyka pracy**, przeprowadzono i opisano charakterystykę badanych alkaloidów, technikami spektrometrii mas i spektrofotometrii w zakresie UV- VIS, przeprowadzono ekstrakcję związków aktywnych z rośliny glistnik jaskółcze ziele (*Chelidonium majus* L), dobrano warunki rozdzielania chromatograficznego badanych alkaloidów w osoczu technikami HPLC i LS-MS i przeprowadzono walidację tych metod. Kolejno techniką RP- HPTC wyznaczono współczynniki podziału badanych związków, przeprowadzono syntezę stałych nanocząstek lipidowych inkorporowanych badanymi alkaloidami, przebadano ich właściwości fizykochemiczne. Najciekawszą częścią, o wyraźnie aplikacyjnym charakterze, były badania in-vitro skuteczności samych leków i enkapsułowanych, w stosunku do komórek raka piersi.

W realizacji ambitnego celu należało zastosować różnorodne techniki i metody badawcze, dlatego Doktorantka współpracowała z innymi jednostkami organizacyjnymi w obrębie Wydziału Chemii i Wydziału Biologii. Jest to obecnie powszechnie stosowana praktyka i pozytywnie świadczy o umiejętności współpracy z różnorodnymi zespołami badawczymi. Opis metodyki pracy wymaga szczegółowych danych z prowadzonych pomiarów, warunków oznaczania konkretnych wielkości i ten rozdział rozprawy spełnia te wymagania. Jednakże niepotrzebnie Doktorantka w każdym podrozdziale, a więc 4-krotnie, powtarza w spisach

odczynników te same, zakupione jako wzorce alkaloidy. W tym rozdziale widoczny jest bardzo duży, często niedoceniany, nakład pracy eksperymentalnej.

Kolejny rozdział zatytułowano **Wyniki badań i dyskusja**. Materiał tutaj zaprezentowany ma duży walor poznawczy, a zapoczątkowane badania aplikacyjne, mogą doprowadzić do ciekawych zastosowań klinicznych. Jakkolwiek w literaturze opisano metody rozdzielania chromatograficznego tych alkaloidów, Pani mgr Aleksandra Czeszak skupiła się głównie na oznaczaniu tych związków w osoczu. Opracowała warunki ich rozdzielania i oznaczania technikami HPLC i LC-MS i przeprowadziła walidacje metod. Szkoda, że Doktorantka nie dysponowała realnym osoczem, po dostaniu się tych związków do organizmu. Wówczas należałoby się spodziewać głównie metabolitów tych związków lub ich mieszanin z wyjściowymi alkaloidami. Ciekawą częścią rozprawy jest również rozdział dotyczący wyznaczania współczynników podziału tych związków techniką RP-HPTC. Oprócz wyznaczenia log P uwzględniła fakt, że w przypadku dysocjacji związku, współczynnik ten w znacznym stopniu zależy od wartości pH środowiska, dlatego słusznie wyznaczyła również współczynnik log D.

Bardzo ciekawą częścią pracy są badania nad syntezą i charakterystyką stałych nanocząstek lipidowych, inkorporowanych badanymi alkaloidami, badania ich uwalniania i ocena aktywności cytotoksycznej na wybranych liniach komórkowych. Na podstawie przeglądu literatury istniały przesłanki do stwierdzenia wpływu alkaloidów izochinolinowych na aktywność proliferacyjną komórek raka, jakkolwiek opinie nie były jednoznaczne.

W tej części pracy przeprowadzono optymalizację syntezy SLN i badania ich właściwości – zarówno w odniesieniu do samych nanocząstek, jak i inkorporowanych alkaloidami. W badaniach stabilności odnotowano korzystny wpływ niskiej temperatury na wielkość nanocząstek, na współczynnik polidispersyjności i potencjał zeta. W badaniach kinetyki uwalniania alkaloidów, przeprowadzonych z zastosowaniem komór Franza wykazano, że szybkość uwalniania zależy głównie od lipofilowości i rozpuszczalności związków. Zbadano efektywność enkapsulacji (EE) i generalnie była ona zadawalająca. Doktorantka przeprowadziła również charakterystykę matrycy lipidowej i jakkolwiek w badaniach stosowano doskonałe techniki: XRD, DSC, SEM i TEM, opis wyników badań jest dosyć powierzchowny, bez jednoznacznych wniosków.

W badaniach na modelu doświadczalnym, którym były linie komórek nowotworowych MDA-MB-231 wykazano aktywność cytotoksyczną samych SLN, inkorporowanych alkaloidami

i samych związków. Stopień hamowania proliferacji komórek rakowych zależał od zastosowanej dawki i formy podania. Chciałabym przypomnieć, że w pracach na nowotworowych liniach komórkowych należy również prowadzić badania na liniach komórek prawidłowych (nienowotworowych), które powinny pochodzić z takiego samego narządu, z którego pochodziła linia nowotworowa. Zachęcam, aby przed opublikowaniem wyników badań z doktoratu, uzupełnić o wymienione badania.

Pracę zamyka wnikliwa analiza wyników badań wraz z ich dyskusją i ostrożnie sformułowane wnioski. Rozprawa została dobrze zaprojektowana i wykonana. Chciałabym również podkreślić trafność wyboru metodologii, dzięki której wytyczony przez Panią Promotor i Doktorantkę cel został osiągnięty.

Wywiązując się z obowiązku, jaki spoczywa na recenzentach chciałabym wskazać pewne uchybienia, które pojawiły się w rozprawie i proszę o wyjaśnienie pewnych kwestii:

- proszę o wyjaśnienie w jakim celu prowadzono ekstrakcję badanych alkaloidów z *Chelidonium majus* L, technikami wspomaganymi ultradźwiękami i promieniowaniem mikrofalowym, jeśli tego ekstraktu nie badano na liniach komórkowych w formie wolnej ani enkapsulowanej?
- brak w pracy chromatogramów ekstraktów, które z pewnością zawierały wiele innych związków, jeśli ekstrakcję prowadzono w opisanych warunkach
- w Celu rozprawy doktorskiej zaplanowano „...opracowanie metodyki oznaczania powyższych związków w płynach biologicznych.....”, tymczasem w pracy oznaczano te związki jedynie w osoczu
- w rozprawie Doktorantka używa terminu „kwaśne pH”. Przypominam, że pH ma wartość liczbową, wynikającą z ujemnego logarytmu stężenia jonów wodorowych, $\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$. Kwaśne, zasadowe lub obojętne może być środowisko reakcji, itp.
- zamiast terminu „rozdział chromatograficzny „, zaleca się stosowanie „, rozdzielanie chromatograficzne”.

Powyższe uwagi nie wpływają w istotny sposób na moją bardzo pozytywną ocenę pracy.

W podsumowaniu stwierdzam, że badania przeprowadzone w ramach rozprawy mgr Aleksandry Czeszak posiadają istotne elementy nowości naukowej w zakresie

charakterystyki wybranych alkaloidów izochinolinowych i wykazania ich aktywności cytotoksycznych zarówno w formie wolnych związków jak i w formie enkapsułowanej. Część wyników opublikowano w renomowanym czasopiśmie naukowym New Journal of Chemistry (IF=3,069) i prezentowano na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Doktorantka posiada w dorobku naukowym jeszcze jedną publikację nie związaną z rozprawą, o współczynniku oddziaływania IF=3,643 i dwie w czasopismach krajowych. Ponadto liczne komunikaty i postery na konferencjach w kraju i za granicą.

Stwierdzam, że Doktorantka posiada dużą wiedzę w zakresie reprezentowanej dziedziny naukowej, umiejętność prowadzenia badań z zastosowaniem szerokiego spektrum instrumentacji i oryginalność w rozwiązywaniu problemu naukowego. Uważam, że rozprawa doktorska mgr Aleksandry Czeszak spełnia wszystkie wymagania formalne określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.z 2017r poz.1789).

Wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Aleksandry Czeszak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę duży materiał eksperymentalny, oryginalność tematyki i wykazane umiejętności wykorzystania najbardziej nowoczesnych technik analitycznych w rozwiązywaniu trudnego problemu badawczego wnioskuję o wyróżnienie pracy. Doktorantka posiada dobry dorobek naukowy i jestem przekonana, że większość wyników z rozprawy doktorskiej, do tej pory niepublikowanych, znajdzie uznanie u redaktorów specjalistycznych czasopism naukowych.



