

OCENA



rozprawy doktorskiej magistra Wojciecha Snocha
pt. "Nowe estry cukrów i kwasów (R)-3-hydroksyalkanowych – synteza,
charakterystyka fizyko-chemiczna oraz ocena ich potencjału biologicznego"
przygotowanej w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego
Habera Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem dra hab. Macieja Guzika,
prof. IKiFP PAN oraz w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem prof. dra hab. Andrzeja Bojarskiego

Wydział

Biochemii, Biofizyki

i Biotechnologii

Zakład Biologii Komórki

BANK KOMÓREK

Wytwórnia Produktów
Lecznicych Terapii

Zaawansowanej

Kierownik

Prof. dr hab. Justyna Drukała

Estry cukrowe kwasów tłuszczowych stanowią grupę hydrofiliowo-lipofilowych, biokompatybilnych i biodegradowalnych powierzchniowo czynnych związków chemicznych, które dzięki tym właśnie cechom znajdują zastosowanie zarówno w przemyśle spożywczym, kosmetycznym jak i farmaceutycznym, gdzie wykorzystywane są do tworzenia miceli i emulsji oraz stabilizacji pian. Co ważne, wykazano, że związki te mogą wpływać bezpośrednio na mikroorganizmy zwiększając przepuszczalność błon komórkowych i inaktywując białka przezbłonowe, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórek. Na szczególną uwagę zasługuje możliwość wykorzystania estrów cukrowych kwasów tłuszczowych w przemyśle farmaceutycznym, jako nośników leków, które z jednej strony mogą modulować ich uwalnianie do organizmu, z drugiej zaś bezpośrednio wpływać na funkcje komórek. Wciąż poszukuje się nowych, przyjaznych dla środowiska metod tworzenia estrów z wykorzystaniem tanich, łatwo dostępnych substratów. Dodatkowo opracowywane są modyfikacje tych związków w celu usprawnienia wchłaniania leków, ale także uczynienia ich łatwo biodegradowalnymi.

Niewątpliwie farmakologia nowotworów stanowi obszar najintensywniej rozwijających się badań i poszukiwań skutecznych strategii walki z tymi chorobami. Efektywność dostarczenia leku i jego kontrolowane uwalnianie w organizmie związane jest z osnową leku, która może być właśnie tworzona z estrów cukrowych kwasów tłuszczowych.

W ten nurt badawczy doskonale wpisują się prace pana mgr Wojciecha Snocha, których wyniki zaprezentowane zostały w przedłożonej do recenzji dysertacji.

Celem pracy była synteza, charakterystyka i określenie właściwości biologicznych nowych estrów cukrów i kwasów (R)-3-hydroksyalkanowych.

W celu uzyskania zaproponowanych estrów jako komponentę hydrofilową wykorzystano glukozę, galaktozę oraz laktozę - odpad przemysłowy. Wybór tego źródła, będącego odpadem przemysłowym wpisuje się doskonale w idee ochrony środowiska.

Jako komponentę hydrofobową zaproponowano kwasy tłuszczowe pochodzące z depolimeryzacji bakteryjnych poliestrów-polihydroksyalkanianów. Ich produkcja na skalę przemysłową opiera się o materiały odnawialne i wydajnie wykorzystujące dostępne zasoby naturalne.

Formalny opis rozprawy

Dysertacja stanowi zbiór czterech opublikowanych prac, których Pan mgr Snoch jest wiodącym autorem. Stanowią one spójną całość, co jest zgodne z art. 13 pkt 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami, to jest z zapisem mówiącym, że rozprawa doktorska może mieć formę „(...) *spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych* (...)). Prace zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (sumaryczny współczynnik oddziaływania 20,623).

Ponieważ publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są wieloautorskie, do rozprawy dołączono oświadczenia współautorów o ich wkładzie w powstanie prac. Według oświadczeń współautorów Pan mgr Wojciech Snoch jest głównym autorem,

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48(12) 664 61 45

fax +48(12) 664 69 02

email:

justyna.drukała@uj.edu.pl

wykonał większą część doświadczeń w prezentowanych artykułach, brał czynny udział w fazie planowania, interpretacji i opracowywania wyników oraz pisanie manuskryptów.

Gdy rozprawę doktorską stanowią opublikowane prace recenzent ma znacznie ułatwione zadanie, albowiem publikacje już zostały poddane wnikliwej ocenie przez wskazanych przez redakcję, w której interesie jest utrzymanie wysokiego rankingu czasopisma, niezależnych recenzentów będących specjalistami w danej dziedzinie. Biorąc pod uwagę pozytywną ocenę publikacji przez niezależnych redaktorów, recenzentów i dołączając do tego własną ocenę nie mam merytorycznych zastrzeżeń do ich formy i zawartości.

Publikacje poprzedzone są obszernym, 72-stronicowym opisem zaprezentowanych w nich wyników, zapoczątkowanym streszczeniem w języku polskim i angielskim i wykazem skrótów oraz graficznym przedstawieniem zakresu prac badawczych, który dobrze ilustruje logicznie zaplanowaną sekwencję badań będących realizacją zamierzonego celu.

Rozdział pierwszy to syntetyczny wstęp i przybliżenie głównych problemów badawczych liczący 10 stron i zawierający 3 ryciny. W rozdziale drugim przedstawiono cel pracy oraz wyróżniono 5 celów szczegółowych. Rozdział trzeci to wykaz artykułów stanowiących pracę doktorską z opisem wkładu pracy mgra Stocha w ich powstawanie. W rozdziale czwartym zostały syntetycznie omówione wyniki badań zawarte w poszczególnych publikacjach każdorazowo podsumowane i zakończone wnioskami z badań. Rozdział piąty to całościowe podsumowanie i wnioski końcowe. Rozdział szósty to spis literatury liczący 147 pozycji.

Przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia wymogi formalne rozprawy doktorskiej.

Ocena merytoryczna:

Streszczenie pracy, przygotowane zarówno w języku polskim, jak i angielskim, jest informatywne, ale zawiera jedynie opis celów przeprowadzonych eksperymentów i przywołuje cztery publikacje będące istotą dysertacji. Zabrakło mi w streszczeniu ogólnego wyniku badań i podsumowania.

Syntetyczny wstęp pracy w przejrzysty sposób wprowadza w zagadnienie rozprawy. W podrozdziałach Wstępu Doktorant zaprezentował dane epidemiologiczne dotyczące chorób nowotworowych, ogóle strategię walki z nimi przywołując najnowsze metody związane z inżynierią genetyczną i nanotechnologią.

Uwaga: na str. 14 wspominając o terapii celowanej Autor pisze: “polegają one na podawaniu specjalnie wyhodowanych przeciwciał monoklonalnych...”. Bardzo proszę o skomentowanie tego zdania

W tym rozdziale autor zaznaczył potrzebę poszukiwania nowych, skuteczniejszych strategii dostarczania leków, ale także biokompatybilnych związków, które będą usprawniały wchłanianie tych leków.

Po krótkim scharakteryzowaniu estrów cukrowych kwasów tłuszczowych Autor szerzej opisał użyty w swoich badaniach substrat - laktozę – argumentując zasadność jej wykorzystania do tworzenia nowych estrów. Z kolei zostały opisane źródła komponenty hydrofobowej estrów i – ponownie – szerzej zaprezentowana została grupa polihydroksyalkanianów (PHA), naturalnych poliestrów, które mogą być źródłem kwasów tłuszczowych. PHA produkowane są przez bakterie, zatem można je wykorzystywać do wytwarzania tych związków na skalę przemysłową stosując naturalne zasoby materiałów odnawialnych. W kolejnym podrozdziale omówione zostały metody syntezy ECKT – chemiczna i enzymatyczna z uwzględnieniem ich wad i zalet. Autor wyraźnie wskazał na wyższość metod biokatalitycznych ze względu na ich selektywność, a także mniejszą szkodliwość dla środowiska biokatalizatora, co miało bezpośrednie przełożenie na zastosowanie biokatalizy w zaprezentowanych badaniach.

Wstęp w sposób jasny wprowadza w zagadnienie podjętych badań, a informacje w nim zawarte poparte danymi literaturowymi wskazują na dobre rozeznanie Autora w literaturze przedmiotu. Po sformułowaniu celów pracy, Autor dokonał omówienia publikacji składających się na dysertację.

W publikacji:

Wojciech Snoch, Mateusz Tataruch, Olga Zastawny, Ewelina Cichoń, Mathilde Gosselin, Hubert Cabana, Maciej Guzik "Hollow silica microspheres as robust immobilization carriers" 2019, *Bioorganic Chemistry* 93, 102813; DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.02.038

zaprezentowano koncepcję biokatalitycznej syntezy estrów cukrowych, optymalizację warunków estryfikacji z uwzględnieniem 26 lipaz. Przeprowadzono detekcję ECKT za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizującym.

Zbadano także wpływ immobilizacji lipaz na efektywność syntezy ECKT.

Wykazano, że lipaza EL070 firmy Eucodis Bioscience immobilizowana na aminowanych azurowych nośnikach w reaktorze przepływowym pozwala na wielokrotne użycie enzymu i prowadzenie reakcji w warunkach ciągłych. Czynnikiem limitującym jest jednak użycie 20%, trudnego do odpłukania, toksycznego DMSO koniecznego do rozpuszczenia komponenty cukrowej.

W drugiej publikacji:

Wojciech Snoch, Karolina Stępień, Justyna Prajsnar, Jakub Staroń, Maciej Szaleniec, Maciej Guzik, "Influence of Chemical Modifications of Polyhydroxyalkanoate-Derived Fatty Acids on Their Antimicrobial Properties" 2019, *Catalysts*, 9(6), 510, DOI: 10.3390/catal9060510

opisana została modyfikacja komponenty hydrofobowej dla usprawnienia wiązania – wprowadzenie atomu halogenowca – fluoru lub podstawnika go zawierającego do łańcucha węglowego dla zwiększenia potencjału biologicznego leków. Jest to pierwsze, oryginalne doniesienie, które dotyczy zabezpieczania grupy hydroksylowej monomerów PHA lub podstawienia przez podstawnik halogenowy.

Przeprowadzono także analizy mikrobiologiczne – badano minimalne stężenie zsyntetyzowanych ECKT powstałych ze zmodyfikowanych i niemodyfikowanych monometrów PHA hamujące wzrost bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych i grzybów drożdżopodobnych. Monomery PHA z grupą hydroksylową wykazywały nieco wyższą aktywność bakteriobójczą, jednak wielokrotnie wyższe – w porównaniu z stężeniami leków użytych jako kontrole – stężenia ECKT konieczne do wywołania efektu bójczego.

Wykazano, że związki te nie kwalifikują się do zastosowań przeciwbakteryjnych lub przeciwgrzybiczych.

W trzeciej publikacji:

Wojciech Snoch, Dawid Wnuk, Tomasz Witko, Jakub Staroń, Andrzej J. Bojarski, Ewelina Jarek, Francisco J. Plou, Maciej Guzik "In Search of Effective Anticancer Agents—Novel Sugar Esters Based on Polyhydroxyalkanoate Monomers" 2021, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7238, DOI: 10.3390/ijms22137238

opisane zostały wyniki badań aktywności antyproliferacyjnych ECKT względem komórek raka prostaty i czerniaka. Dokonano także analizy zmian w budowie cytoszkieletu komórek pod wpływem ECKT. Wyniki badań wskazują, iż badane związki nie mogą konkurować z chemioterapeutykami, natomiast ich aktywność antyproliferacyjna może być potencjalnie addytywnie wykorzystana, jeśli użyć ich jako osnowy dla tych leków.

W czwartej publikacji

Wojciech Snoch, Ewelina Jarek, Dusan Milivojevic, Jasmina Nikodinovic-Runic, Maciej Guzik "Physicochemical studies of novel sugar fatty acid esters based on (R)-3-hydroxylated acids derived from bacterial polyhydroxyalkanoates and their potential environmental impact" 2023, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9(11), 1112053, DOI: 10.3389/fbioe.2023.1112053

zaprezentowana została wstępna charakterystyka fizykochemiczna i zarysowano potencjalny wpływ badanych związków na środowisko.

Zwrócono uwagę na konieczność dopracowania techniki oczyszczania preparatywnego, gdyż nie uzyskano rozdziału mono- od diestrów co istotnie wpłynęło na charakterystykę fizykochemiczną (dynamiczne napięcie powierzchniowe, krytyczne stężenie micelizacji, zdolność do stabilizacji emulsji).

Nie udało się określić ważnego z punktu widzenia zastosowań w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym wskaźnika stabilności emulsji z powodu krótkiego czasu życia emulsji.

Stwierdzono, że badane ECKT wykazują pewną aktywność stabilizującą emulsję, jednak wymagane są dodatkowe badania optymalizujące stężenie ECKT, metody mieszania oraz dodatek kosurfaktantu.

Ponieważ środki powierzchniowo czynne uwalniane są do środowiska naturalnego jako postaci ścieków, bardzo istotne jest zbadanie cytotoksyczności tych substancji. W pracy wykorzystano organizm modelowy – nicien Nematoda. Zakres stężeń badanych związków wykazujących działanie przeciwnowotworowe był znacznie niższy niż stężeń toksycznych dla nicieni, co sugeruje że potencjalne zastosowania w farmacji nie powinny implikować ekotoksyczności.

Biorąc pod uwagę uzyskane i opisane przez Doktoranta wyniki badań chciałabym w tym miejscu prosić Doktoranta o komentarz w kwestii potencjalnego zastosowania nowych estrów w inżynierii tkankowej. Czy nowe estry mogą stanowić potencjalny nośnik dla komórek implantowanych w celu regeneracji tkanek?

Podsumowanie

Publikacje będące podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej mają znaczenie zarówno poznawcze, jak i aplikacyjne. Obejmują swoim zakresem szereg aspektów związanych z opracowaniem przyjaznej dla środowiska naturalnego syntezy nowych estrów, wykorzystującej surowce wtórne oraz naturalne poliestry. Prezentują wyniki eksperymentów dotyczących ich wpływu na żywotność bakterii, komórek nowotworowych i modelowych nicieni, co świadczy o kompleksowym, interdyscyplinarnym podejściu w badaniach nad nową grupą związków o potencjale aplikacyjnym. Autor zastosował w swoich badaniach szerokie spektrum metod badawczych i zaprezentował krytyczne podejście do wyników mając świadomość potrzeby zgłębienia analiz, co świadczy o Jego dojrzałości naukowej.

Weryfikując potencjalne zastosowanie nowych estrów do produkcji kosmetyków czy leków konieczna będzie dalsza ocena toksykologiczna na poziomie komórkowym, ale także ogólnosystemowa w modelu in vivo. Zaprezentowane wyniki stanowią jednak bardzo dobry punkt wyjścia do pogłębionych badań nad mechanizmem działania nowych ECKT na komórki w kontekście aktywności przeciwnowotworowej.

Na podstawie oceny indywidualnego wkładu pracy Pana mgra Wojciecha Snocha w powstanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art.13.1.5 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789). Zgodnie z ustawą, przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wnoszę zatem o dopuszczenie przez Wysoką Radę Naukową Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk w Krakowie Pana mgra Wojciecha Snocha do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.