

Prof. dr hab. n. med. Aleksandra Kawczyk-Krupka
Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych,
Angiologii, Medycyny Fizykalnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Batorego 15, 41-902 Bytom
tel/fax: +48 32 7861630

Bytom, 14.10.2024r

wpl.
dnia 10-10-2024

Uniwersytet Medyczny
we Wrocławiu



RPW/19027/2024 P
Data: 2024-10-18

Recenzja pracy doktorskiej na stopień doktora

mgr biotechnologii Sebastiana Makucha

Pod tytułem: „Cukrowa pochodna cynkowej ftalocyjaniny jako innowacyjne narzędzie terapii fotodynamicznej w leczeniu łuszczycy”, wykonanej pod merytoryczną opieką promotora: Prof. dr hab. n. med. Piotra Ziółkowskiego oraz promotora pomocniczego

Pani dr n. med. Marty Woźniak, procedowanej przez Radę Dyscypliny Nauk

Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Rozprawa doktorska mgr biotechnologii Sebastiana Makucha obejmuje cykl czterech prac, w których Doktorant jest pierwszym autorem, o sumarycznej punktacji: **IF: 17,03 i MEiN: 520**. Są to:

1. Glycoconjugation as a promising treatment strategy for psoriasis, **Makuch Sebastian**, Woźniak Marta, Krawczyk Monika, Pastuch-Gawołek Gabriela, Szeja Wiesław, Agrawal Siddarth: Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2020, vol. 373, nr 2, s. 204-212,
2. The impact of proinflammatory cytokines and imiquimod on GLUT1 in HaCaT keratinocytes - a potential anti-psoriatic therapeutic target?, **Makuch Sebastian**, Kupczyk Piotr, Makarec Alicja, Chodaczek Grzegorz, Ziółkowski Piotr, Woźniak Marta: Cellular Physiology and Biochemistry, 2023, vol. 57, nr 2, s. 54-62,
3. In vitro and in vivo antipsoriatic efficacy of protected and unprotected sugar-zinc phthalocyanine conjugates **Makuch Sebastian**, Kupczyk Piotr, Woźniak Marta, Makarec Alicja, Lipińska Maja, Klyta Magdalena, Sulecka-Zadka Joanna, Szeja Wiesław, Gani Mariachiara, Rapozzi Valentina, Ziółkowski Piotr, Smoleński Piotr.: Pharmaceutics, 2024, vol. 16, nr 6, art.838 [20 s.],
4. An update on photodynamic therapy of psoriasis - current strategies and nanotechnology as a future perspective **Makuch Sebastian**, Drózdź Mateusz, Makarec Alicja, Ziółkowski Piotr, Woźniak Marta.: International Journal of Molecular Sciences, 2022, vol. 23, nr 17, art.9845

Przedstawiona rozprawa doktorska została przedstawiona na 101 stronach, w 10 rozdziałach, obejmujących spis treści, wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki i wnioski, cykl publikacji stanowiących rozprawę doktorską, streszczenie w języku polskim i angielskim, zgodę Komisji Etycznej, CV i dorobek naukowy Autora oraz oświadczenia współautorów.

W rozprawie doktorskiej mgr Sebastian Makuch dokonał oceny metody glikokoniugacji cynkowej ftalocyjaniny oraz jej potencjalnego zastosowania w terapii fotodynamicznej łuszczycy, poprzez wykorzystanie nadekspresji transportera glukozy GLUT1. Ponadto celem pracy Doktoranta było zbadanie wpływu cytokin prozapalnych na ekspresję GLUT1 w keratynocytach z wykorzystaniem łuszczycopodobnego modelu *in vitro* oraz *in vivo*. Na powyższe badania Doktorant otrzymał zgodę Lokalnej Komisji Etycznej, którą załączył do dysertacji. Głównym celem pracy doktorskiej mgr Sebastiana Makucha była ocena, czy nadekspresja transportera glukozy GLUT1 w keratynocytach stymulowana przez cytokiny prozapalne może być skutecznie wykorzystana w celu zwiększenia selektywności glikokoniugatów cynkowej ftalocyjaniny.

Aby zrealizować cel główny Autor wyznaczył cele szczegółowe, a mianowicie :
przedstawienie metody glikokoniugacji jako potencjalnej strategii terapii celowanej łuszczycy, mającej na celu zwiększenie selektywności leków poprzez wykorzystanie transportera glukozy GLUT1 w proliferujących keratynocytach, ocenę wpływu cytokin prozapalnych (IL-6, IL-17, IL-23, IL-36, TNF- α) oraz imikwimodu (IMQ) na ekspresję transportera GLUT1 w keratynocytach HaCaT. analizę mechanizmów transportu glikokoniugatów cynkowej ftalocyjaniny w keratynocytach HaCaT stymulowanych cytokinami, ocenę skuteczności terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem glikokoniugatów cynkowej ftalocyjaniny na łuszczycopodobnym modelu *in vitro* oraz *in vivo*, przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat terapii fotodynamicznej w leczeniu łuszczycy oraz omówienie potencjalnych przyszłych zastosowań nanotechnologii w tej dziedzinie.

Podsumowując tę część recenzji, należy skonstatować, że rozprawa mgr Sebastiana Makucha dobrze prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta, znajomość nowatorskich form terapii z wykorzystaniem terapii fotodynamicznej, pokazuje umiejętność prowadzenia pracy naukowej, a tym samym demonstrowanie spełnienia w tym względzie wymagań ustawowych, które dotyczą rozpraw na stopień doktora nauk.

Pierwszą pracą w cyklu dysertacji doktorskiej Doktoranta jest artykuł przeglądowy, dotyczący możliwości zastosowania glikokoniugacji w leczeniu łuszczycy jako potencjalnej metody terapii celowanej, wykorzystującej przyłączenia leków przeciwłuszcycowych do cukrów.

Druga publikacja ocenia wpływ stymulacji cytokinami prozapalnymi (IL-6, IL-17, IL-23, IL-36 i TNF- α), a także imikwimodem na ekspresję transportera GLUT1. Do badań Doktorant wykorzystał nieśmiertelnioną linię komórkową ludzkich keratynocytów HaCaT. Komórki stymulowane były cytokinami lub imikwimodem, po czym sprawdzona była ekspresja genów za pomocą qPCR oraz poziom białka GLUT1 przy użyciu immunofluorescencji oraz metody Western blot. Dodatkowo, Doktorant sprawdzał poziom wychwytu glukozy przez komórki HaCaT po stymulacji i porównano go z niestymulowanymi komórkami kontrolnymi.

Trzecia praca z cyklu przedstawia syntezę chemiczną, charakterystykę oraz ocenę aktywności biologicznej cukrowych pochodnych cynkowej ftalocyjaniny na łuszcycopodobnym modelu komórkowym oraz mysim. Do badań *in vitro* Doktorant wykorzystał nieśmiertelnioną linię komórkową ludzkich keratynocytów HaCaT, badania *in vivo* przeprowadził na modelu mysim z wywołanym zapaleniem skóry (60 myszy) przy użyciu imikwidomu przez 7 dni. Zwierzęta podzielił na sześć grup: a) grupa kontrolna; b) IMQ z DMSO; c) kontrola naświetlania; d) grupa z niską dawką Glu-4-ZnPc-P-PDT (0,30 mg/kg); e) średnią dawką (0,60 mg/kg) i f) wysoką dawką (1,20 mg/kg). Mysiom podawane były dożylnie koniugaty cynkowej ftalocyjaniny rozpuszczone w DMSO, a następnie po 4h naświetlany był ogolony obszar skóry laserem o dawce energii 15 J/cm² przez 7 minut. Zmiany skórne po terapii Doktorant oceniał za pomocą skali PASI codziennie przez 7 dni, a następnie pobrane były do dalszych badań próbki skóry, śledziona, wątroby oraz krwi, w tym do badań histologicznych i do pomiaru poziomów cytokin (IL-6, IL-17A, IL-23) metodą ELISA.

Analizy statystycznej wyników Doktorant dokonał przy użyciu oprogramowania Prism 8.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) oraz Anova. Test t zastosował dla prób niezależnych, a wyniki badań *in vitro* oraz pozyskanych z materiału biologicznego myszy przedstawił jako średnią \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów. Do określenia liczby zwierząt użył obliczenia wielkości próby i analizę mocy testu; wartości p mniejsze niż 0,05 uznał za statystycznie istotne.

W opisie wyników badań Autor przedstawia rezultaty analizy qPCR które wykazały, iż stymulacja komórek HaCaT IL-6, IL-17, IL-23 oraz IL-36, prowadziła do wzrostu ekspresji genu SLC2A1 kodującego GLUT1, podczas gdy TNF- α nie wpłynął znacząco na jego ekspresję. Analiza immunofluorescencyjna dodatkowo potwierdziła uzyskany wynik. Ocena densytometryczna analizy Western blot z kolei wykazała, iż wszystkie z badanych cytokin oraz imikwimod, zwiększają poziom białka GLUT1.

Wyniki badań przeprowadzonych przez Doktoranta i przedstawionych w kolejnej pracy jednoznacznie potwierdziły, iż tetra- substytuowana glukoza pochodna cynkowej ftalocyjaniny z zabezpieczeniami acetylowymi (Glu-4-ZnPc-P) wykazuje najwyższą fotocytotoksyczność wobec komórek HaCaT stymulowanych cytokinami ($IC_{50} = 2.55 \mu M$), w porównaniu do Glu-4-ZnPc ($IC_{50} = 22.7 \mu M$), Gal-4-ZnPc-P ($IC_{50} = 7.13 \mu M$) oraz ZnPc ($IC_{50} = 5.842 \mu M$) po 24 godzinach. Ponadto Doktorant wykazał, że po 24-godzinnej inkubacji komórek ze związkami w ciemności bez naświetlania, aktywność cytotoksyczna koniugatów ZnPc z cukrami była niższa w porównaniu do ZnPc.

Dalsze badania Doktoranta dowiodły, iż stymulacja cytokinami prozapalnymi IL-6, IL-17A i IL-23, zwiększa wewnątrzkomórkową akumulację związków Glu-4-ZnPc i Glu-4-ZnPc-P, podczas gdy selektywny dla GLUT1 inhibitor BAY-876 zmniejsza akumulację obu związków w komórkach HaCaT, a spośród cytokin IL-17A wykazała największy wpływ na akumulację związków przez keratynocyty, powodując wzrost wychwytu Glu-4-ZnPc o 56.3% oraz Glu-4-ZnPc-P o 27.6%. Autor dysertacji wykazał, że w przeciwieństwie do Glu-4-ZnPc i Glu-4-ZnPc-P, średnia intensywność fluorescencji komórek HaCaT traktowanych związkami Gal-4-ZnPc-P oraz ZnPc nie uległa zmianie, zarówno po stymulacji cytokinami, jak i po inkubacji z inhibitorem BAY-876, natomiast zgodnie z oczekiwaniami Badacza, wychwyty wewnątrzkomórkowy koniugatu Glu-4-ZnPc z niezabezpieczoną częścią cukrową był znacznie wydajniejszy od pozostałych związków.

Obserwacje prowadzone przez mgr Sebastiana Makucha za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej potwierdziły, że wszystkie z badanych ftalocyjanin, a w szczególności Glu-4-ZnPc, lokalizowały się preferencyjnie w mitochondriach komórek HaCaT. Pozostałe pochodne, czyli Glu-4-ZnPc-P oraz Gal-4-ZnPc-P, wykazały niższą wewnątrzkomórkową akumulację w mitochondriach, w porównaniu do Glu-4-ZnPc oraz nieskoniugowanej ZnPc. Subkomórkowa kolokalizacja wszystkich testowanych związków z barwnikiem specyficznym dla lizosomów była znikoma. Zgodnie z hipotezą badawczą Doktoranta, glukoza pochodna z niezabezpieczonymi resztami cukrowymi charakteryzowała się najwyższą wydajnością

wychwytu komórkowego, co było spójne z wynikami uzyskanymi przez Badacza metodą cytometrii przepływowej.

Naświetlanie badanych ftalocyjanin, zgodnie z założeniami Autora Dysertacji, prowadziło do produkcji reaktywnych form tlenu (ROS), jednego z głównych mediatorów śmierci komórkowej indukowanej przez PDT. W badaniu określającym poziom produkcji ROS mgr Sebastian Makuch wykazał, iż preinkubacja komórek HaCaT z IL-17A znacząco zwiększała produkcję ROS po zastosowaniu Glu-4-ZnPc-P.

Kolejne badania Doktoranta przeprowadzone na mysim modelu łuszczycy indukowanej imikwimodem (IMQ) z zastosowaniem dożylniej iniekcji koniugatu Glu-4-ZnPc-P z następowym naświetlaniem, wykazywały istotną redukcję wskaźnika PASI, przywrócenie prawidłowej morfologii skóry w analizie histopatologicznej ze zmniejszeniem nacieków leukocytarnych i grubości naskórka oraz spadek poziomu IL-6 oraz IL-17A w surowicy. Tym samym otrzymane przez Doktoranta wyniki potwierdziły działanie przeciwzapalne tego związku na łuszczycopodobnym modelu zapalenia skóry indukowanym imikwimodem.

Wyniki pracy doktorskiej mgr Sebastiana Makucha podkreślają wysoki potencjał terapeutyczny cukrowych pochodnych cynkowych ftalocyjanin, w szczególności Glu-4-ZnPc-P, w kontekście celowanej terapii fotodynamicznej łuszczycy. Opisane w niniejszej rozprawie wyniki mogą stanowić solidną podstawę dla przyszłych badań klinicznych nad zastosowaniem koniugatów glukozy w leczeniu łuszczycy oraz innych chorób skóry.

Doktorant w części eksperymentalnej dokładnie opisał materiały i metody badawcze.

Przedstawione do recenzji prace wchodzące w skład dysertacji cechuje trafność doboru metod i narzędzi badawczych oraz ich szeroki wachlarz. Metodyka jest aktualna i nowoczesna i uznana jako standardowo stosowana w badaniach eksperymentalnych. Doktorant wykazał się umiejętnością przeprowadzenia m.in. testu MTT do oznaczeń aktywności metabolicznej komórek (a tym samym żywotności), cytometrii przepływowej, mikroskopii fluorescencyjnej, mikroskopii konfokalnej, immunofluorescencji, analizy Western blot, PCR, spektrometrii NMR, metod immunoenzymatycznych ELISA oraz oceny preparatów histopatologicznych. Doktorant udowodnił umiejętności ich zastosowania. Wyniki badań zostały przedstawione przez Doktoranta w publikacjach w formie tabel i wykresów, jak też zdjęć spod mikroskopu fluorescencyjnego i konfokalnego.

W załączonych publikacjach Autor przeprowadził umiejętnie dyskusję, w której profesjonalnie porównał otrzymane wyniki badań do rezultatów opisanych przez innych badaczy. Bibliografia została trafnie dobrana i większość stanowią aktualne publikacje z ostatnich lat.

Uwzględniając powyższe można stwierdzić, że nadrzędny cel rozprawy doktorskiej został przez Doktoranta zrealizowany.

Całość pracy doktorskiej **mgr Sebastiana Makucha** oceniam bardzo wysoko. Doktorant przedstawił ciekawe wyniki badań w oparciu o dobrze dobrany model badania. Autor pracy dowiódł tym samym, że potrafi przeprowadzić wzorowo eksperyment naukowy a następnie opracować uzyskane wyniki badań i w sposób przejrzysty przedstawić je czytelnikowi.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na pewne aspekty dysertacji, które warto byłoby udoskonalić. Należą do nich:

1/ korekta sformułowań w opisie metodyki: „stosowano naświetlanie skóry czerwonym laserem o fluencji 15 J/cm² ,

Zręcznie byłoby opisać ten proces jako: naświetlanie światłem czerwonym o długości.. i gęstości (dawki) energii.. „”

2/ korekta błędów ortograficznych, edytorskich i stylistycznych (np. „Z pośród”)

3/ lapidarny opis wybranych zdjęć, tabel i rycin, których dokładniejsza legenda pozwoliłaby czytelnikowi na sprawną ich analizę

Powyższe zastrzeżenia nie umniejszają wysokiej oceny, którą wystawiam Doktorantowi, a jednocześnie dają mi argumentację do zadania pytań i zaproszenia do eksperckiej dyskusji dotyczącej następujących kwestii:

po pierwsze:

1. czym była podyktowana decyzja o wyborze ftalocyjanin jako fotouczulacza, czy znane są Doktorantowi inne fotouczulacze, o udowodnionym skutecznym działaniu leczniczym w przypadku łuszczycy
2. czy oprócz mechanizmu cytotoksycznego, Doktorant rozważał przeprowadzenie eksperymentu z dawkami subletalnymi PDT dla oceny innych mechanizmów działania fotodynamicznego, w tym immunoregulacyjnego i naczyniowego.

Podsumowując pragnę podkreślić oryginalność tematyki i wkładu naukowego Doktoranta, która polega na:

- 1/ udowodnieniu, że stymulacja keratynocytów HaCaT cytokinami prozapalnymi oraz imikwimodem zwiększa poziom ekspresji transportera GLUT1
- 2/ wykazaniu, że glukozowa pochodna cynkowej ftalocyjaniny z zabezpieczeniami acetylowymi Glu-4- ZnPc-P wykazuje wyższą fotocytotoksyczność, w porównaniu do wolnej cynkowej ftalocyjaniny (ZnPc)
- 3/ udowodnieniu, że glukozowa pochodna cynkowej ftalocyjaniny z niezabezpieczoną resztą cukrową Glu-4-ZnPc charakteryzuje się najefektywniejszym transportem wewnątrzkomórkowym spośród badanych ftalocyjanin oraz preferencyjną akumulacją w mitochondriach
- 4/ odkryciu, że koniugat Glu-4-ZnPc-P, po podaniu dożylnym i naświetlaniu ma wysoki potencjał terapeutyczny, a potwierdza tą tezę redukcja wskaźnika PASI, zmniejszenie poziomu cytokin prozapalnych (IL-6, IL-17, IL-23) we krwi oraz do poprawa ogólnej kondycji skóry u myszy z łuszczycopodobnym zapaleniem skóry indukowanym imikwimodem.

Ponadto pracę cechują:

1. Poprawność w sformułowaniu założeń badawczych, tez, celu pracy i wniosków,
2. Poprawność formalno-językowa, Doktorant w publikacjach posługuje się poprawnym słownictwem, charakterystycznym dla prac naukowych, medyczny język angielski jest prawidłowy,
3. Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętności ich zastosowania - Doktorant przedstawia dokładny opis całej procedury badawczej oraz oznaczeń z poszczególnych etapów eksperymentu. Przedstawiona charakterystyka wymienionych metod nie budzi zastrzeżeń,
4. Doskonała oprawa graficzna publikacji, jasny i przejrzysty, pomimo skomplikowanego tematu, sposób przedstawienia wyników.
5. Bibliografia jest trafnie dobrana i adekwatna do prezentowanych treści.

Wniosek końcowy

Rozprawa świadczy o odpowiedniej wiedzy Doktoranta w zakresie projektowania badań i umiejętności analizy osiągniętych wyników. Dysertacja jest poprawnie zredagowana, a drobne

„lapsusy” językowe nie umniejszają rangi osiągniętych wyników. Analizując strukturę pracy i opisy, należy stwierdzić, że Doktorant orientuje się w tematyce rozprawy, opanował pisanie tekstów. Szczegółowa i wnikliwa ocena osiągnięć naukowo-badawczych **mgr Sebastiana Makucha** upoważnia mnie do wyrażenia wysoce pozytywnej opinii. Dojrzałość naukowa Doktoranta poparta jest zdolnością do analitycznego myślenia i trafnego wyciągania wniosków. Rozprawa doktorska udowadnia, że **mgr Sebastian Makuch** jest dojrzałym pracownikiem naukowym, w pełni zdolnym do realizowania samodzielnych, twórczych koncepcji naukowych zasługujących na stopień naukowy doktora. Na podstawie wymienionych przeze mnie wysokich aspektów naukowych i poznawczych powyższej dysertacji uważam, że rozprawa doktorska **mgr Sebastiana Makucha** spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018r r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2018 poz. 1668). Rozprawa została sumiennie przygotowana, a otrzymane wyniki są ważne z punktu widzenia przyszłych badań podstawowych i klinicznych. Doktorant rozwiązał rozważany w pracy problem naukowy, stosując przy tym poprawny warsztat badawczy. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o kontynuowanie postępowania o nadanie **mgr Sebastiana Makucha** stopnia doktora. **Jednocześnie składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej**, z uwagi na wysoką wartość naukową, poziom merytoryczny, oryginalność zastosowanych metod badawczych, publikacje w renomowanych periodykach oraz możliwość przyszłego wdrożenia do praktyki klinicznej a przez to istotny wkład uzyskanych wyników w rozwój nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Do wartości naukowych i poznawczych powyższej dysertacji, zasługujących na wyróżnienie, zaliczam:

- 1/ Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność
- 2/ Duże znaczenie uzyskanych rezultatów dla nauki i praktyki, w tym możliwości ich bezpośredniego przełożenia na codzienną praktykę kliniczną i bezpośrednie zastosowanie praktyczne, zwłaszcza w aspekcie chorób cywilizacyjnych,
- 3/ Nowatorski i aktualny temat,
- 4/ Perspektywiczny i rozwojowy charakter pracy.

Bytom, 14.10.2024r

Aleksandra Kawczyk-Krupka

PROFESOR BADAWCZO-DYDAKTYCZNY
Katedry i Oddziału Klinicznego
Chorób Wewnętrznych, Angiologii
i Medycyny Fizykalnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

prof. dr hab. n. med. Aleksandra Kawczyk-Krupka