



Poznań, 12.01.2024r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Klaudii Szukowskiej

**pt.: „Bioinspirowane materiały katecholowe - synteza, struktura
i zastosowanie w nanomedycynie”**

opracowana na zlecenie Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM

na podstawie pisma L. dz. WCH/503/PN/2-23 z dnia 04.12.2023r.

Rozprawa doktorska mgr Moniki Szukowskiej została zrealizowana w Centrum NanoBioMedycznym Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem Prof. UAM dra hab. Radosława Mrówczyńskiego – uznanego eksperta w dziedzinie chemii nanomateriałów, w tym ich funkcjonalizacji oraz potencjalnych zastosowań w systemach dostarczania leków, a także specjalisty w zakresie chemii katecholi. Zakres prezentowanej pracy w ogólnym zarysie dotyczy otrzymania i charakterystyki polimerów koordynacyjnych, analizy analogów i pochodnych dopaminy oraz opracowania zaawansowanych nanoplatform do terapii antyrakowej.

Tematyka badań podjęta w rozprawie doktorskiej przez mgr Monikę Szukowską jest niezwykle aktualna i istotna nie tylko z naukowego, ale także z praktycznego punktu widzenia, a prace związane z opracowaniem zaawansowanych systemów dostarczania leków, w tym w terapii antynowotworowej, opartych na polimerach koordynacyjnych, nanocząstkach oraz pochodnych katecholowych są przedmiotem badań wielu renomowanych ośrodków naukowych na całym świecie. Potwierdzeniem tego faktu jest znaczna ilość doniesień literaturowych opublikowanych na przełomie ostatnich lat. W zakresie systemów dostarczania leków, od 2010 roku opublikowano ponad 220 000 prac, podczas gdy publikacji nt. katecholi i jego pochodnych w tym samym okresie zaprezentowano ponad 22 000 (dane z bazy SCOPUS z dn. 10.01.2024r.). Dane te jednoznacznie potwierdzają duże znaczenie oraz aktualność tematyki podjętej w rozprawie doktorskiej.

Systemy dostarczania leków obejmują niezwykle szeroką i zróżnicowaną grupę materiałów/systemów, których głównym celem jest skuteczne dostarczenie farmaceutyku/substancji terapeutycznej do pożądanego miejsca w organizmie. Ideę zastosowania wspomnianych systemów stanowi koncepcja celowanego dostarczenia farmaceutyku celem uniknięcia jego niepożądanego działania i/lub negatywnego wpływu na inne, zdrowe komórki w organizmie. Obecnie prowadzone są bardzo szerokie prace w zakresie dostarczania leków, które w największym stopniu obejmują takie zagadnienia jak kontrolowane uwalnianie substancji aktywnej, dostarczanie ukierunkowane,

dostarczanie leków biologicznych, a także wykorzystanie nanomedycyny i nanotechnologii do dostarczania leków. W ostatnich latach dokonał się ogromny postęp, zwłaszcza w zakresie syntezy i modyfikacji nanocząstek, co umożliwia zastosowania tych materiałów jako wielofunkcyjnych platform nie tylko zapewniających skuteczne dostarczenie leku, ale także umożliwiających jednoczesne prowadzenie innego rodzaju terapii, opartych np. na terapii fototermicznej. Celem przeprowadzenia efektywnej funkcjonalizacji nanomateriałów stosuje się niezwykle szerokie grono modyfikatorów, jednak ze względu na charakter systemów dostarczania leków oraz miejsce ich aplikacji, wiele prac skupia się na wykorzystaniu materiałów biopolimerowych oraz bioinspirowanych jako składników systemów dostarczania leków. Szczególną uwagę wzbudza polidopamina, która odznacza się silnymi właściwościami adhezyjnymi, a także biokompatybilnością, co czyni ją interesującym komponentem w opracowywaniu nowej generacji nanomateriałów do zastosowania w medycynie. Należy jednak wyraźnie podkreślić, że opracowanie, a także wytworzenie funkcjonalnych platform o zdefiniowanych cechach i wielokierunkowym działaniu ciągle stanowi poważne wyzwanie.

W ten nurt badawczy doskonale wpisuje się tematyka rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Szukowskiej, której celami, podzielonymi na kilka obszarów tematycznych, były synteza oraz charakterystyka zaawansowanych nanoplatform pod kątem ich zastosowania w systemach dostarczania leków, a także przeprowadzenie procesów polimeryzacji analogów dopaminy oraz ich wnikliwa analiza ze szczególnym uwzględnieniem produktów reakcji i ich charakterystyki, pod kątem możliwości zastosowania w systemach dostarczania leków. W dysertacji wykonano szereg prac eksperymentalnych, które obejmowały:

- otrzymanie i charakterystykę polimerów koordynacyjnych w nanoskali do potrójnej terapii raka wątrobowokomórkowego,
- syntezę nanoplatform opartych o nanocząstki mezoporowatej krzemionki,
- charakterystykę analogów dopaminy zdolnych do polimeryzacji,
- polimeryzację norepinefryny i analizę tego procesu.

Wytworzone nanoplatformy zostały wnikliwie scharakteryzowane pod kątem oceny ich właściwości morfologicznych i fizyko-chemicznych, a także zdolności do załadunku leków oraz kinetyki i profili ich uwalniania. Z kolei w studiach nad analogami dopaminy kluczowa była zaawansowana ocena procesu ich polimeryzacji, analiza produktów pośrednich jak i określenie struktur produktów finalnych. W badaniach tych istotne było także określenie właściwości powierzchni pokrytych otrzymanymi substancjami polimerowymi. W zrealizowanych badaniach Autorka wykorzystwała szerokie spektrum technik analitycznych, ze szczególnym uwzględnieniem różnych technik magnetycznego rezonansu jądrowego, które umożliwiły nie tylko potwierdzenie skuteczności przeprowadzonych procesów, ale także umożliwiły wnikliwą analizę ich mechanizmów oraz pozwoliły na dokonanie wieloaspektowej oceny i charakterystyki wytworzonych układów. Co więcej, w pracy sporo uwagi poświęcono także na ocenę praktycznych właściwości powstałych materiałów pod kątem ich zastosowania w systemach dostarczania leków.

Rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Szukowskiej liczy 217 stron, jest napisana w języku polskim i została zilustrowana 104 rysunkami oraz 9 tabelami. Przedkładana dysertacja przygotowana jest w klasycznym układzie i podzielona jest na 8 części, z czego najważniejsze rozdziały to: Streszczenie/Abstract w języku polskim i angielskim (3 strony), Wstęp literaturowy (42 strony), Cele pracy (2 strony) Dyskusja wyników (102 strony) Część

eksperymentalna (27 stron). Całość pracy zwieńczona jest spisem literatury obejmującym 277 pozycji, które w większości zostały opublikowane w ostatnich 10-15 latach. Cytowana literatura jest bogata i zróżnicowana, ale dobrana

w odpowiedni sposób bowiem zaprezentowane przykłady właściwie ilustrują poruszane w pracy zagadnienia i pomagają nie tylko we właściwym wprowadzeniu w temat dysertacji, ale także ułatwiają interpretację uzyskanych zależności. W pracy zaprezentowano także dorobek naukowy Doktorantki oraz wykaz stosowanych skrótów.

Zaprezentowany wstęp literaturowy obejmuje 42 strony i został podzielony na 3 główne rozdziały i kilka podrozdziałów, w których Autorka przedstawia zagadnienia związane z tematyką pracy oraz zrealizowanymi badaniami. Przybliżono proces otrzymywania oraz mechanizm powstawania polidopaminy, a także opisano jej właściwości i ograniczenia w analizie tej substancji. Sporo miejsca Doktorantka poświęciła też na opisanie analogów dopaminy oraz scharakteryzowanie reakcji polimeryzacji jakim mogą podlegać. W ostatniej części przeglądu literatury przedstawiono najważniejsze informacje związane z zastosowaniem nanoplateform w systemach dostarczania leków oraz opisano jaką funkcję w takich systemach pełnić może polidopamina. Część literaturowa jest interesująca, zawiera szereg wartościowych informacji, a opisane tematy są trafnie dobrane w kontekście całości pracy.

Najobszerniejszą część pracy stanowi Dyskusja wyników, a więc podzielona na 4 główne rozdziały część w której Doktorantka czytelnie przedstawia, jak i omawia oraz interpretuje uzyskane zależności i wyniki badań. Część ta przygotowana jest w sposób jasny, przejrzysty i dobrze zorganizowany i przybliży wspomniane już wyżej główne etapy badań skupione wokół wytworzenia nanoplateform oraz analizie procesów polimeryzacji analogów dopaminy.

W pierwszym etapie prac Doktorantka podjęła próbę otrzymania i charakterystyk polimerów koordynacyjnych w nanoskali do potrójnej terapii raka wątrobowokomórkowego. W tym celu wytworzono nanomateriał o potrójnym działaniu terapeutycznym, w skład którego wchodzi jony żelaza (II), pochodna katecholowa doksorubicyny (otrzymana i wnikliwie scharakteryzowana we wcześniejszym etapie) i ligand dwukleszczowy α,α' -bis[(1-imidazolilo)metylo]-p-ksylenu pokryte powłoką krzemionkową oraz cienką warstwą polidopaminy i dopowane cisplatyną, dwa leki cytostaticzne. Doktorantka przedstawiła obszerną charakterystykę syntezowanych materiałów na każdym etapie ich otrzymywania, jak i zdefiniowała właściwości fototermiczne pod kątem zastosowanie w terapii indukowanej światłem. Doktorantka trafnie i wnikliwie analizuje wpływ poszczególnych parametrów na finalne właściwości materiałów pod kątem ich wykorzystania w systemach dostarczania leków. Jednak za szczególnie interesującą i wartościową uważam część związaną z określeniem profili uwalniania leków, jak i przeprowadzone badania biologiczne. Część ta jest dobrze zaplanowana, a przedstawione rezultaty w logiczny sposób obrazują najważniejsze właściwości syntezowanych platform. Co ważne, w oparciu o analizę tych danych Doktorantka była w stanie wykazać znaczny potencjał aplikacyjny opracowanych układów.

W następnym etapie badań Doktorantka wykorzystuje swoje doświadczenie w tworzeniu powłok krzemionkowych i podejmuje prace nad wytworzeniem nanoplateform opartych o nanocząstki mezoporowatej krzemionki. Materiały te poddano także modyfikacji polidopaminy i dokonano ich charakterystyki dyspersyjno-morfologicznej. Kluczowe w tej części były jednak prace nad załadunkiem doksorubicyny oraz Sorafenibu, leków

istotnych w terapii nowotworowej, do wytworzonych układów. Badania obejmowały zarówno określenie ilości substancji farmaceutycznej w nośniku, jaki i analizę powstałych układów pod kątem potwierdzenia efektywności załadunku, jak i celem zdefiniowania zmian we właściwościach materiałów krzemionkowych po sorpcji leku. Szczególną uwagę Doktorantka skupiła jednak na testach uwalniania doksorubicyny oraz Sorafenibu z matrycy krzemionkowych w różnych warunkach. Wnikliwie przeanalizowano wpływ sposobu prowadzenia testu, a więc zastosowanie mieszania lub wytrząsania oraz wpływ zmiennych warunków procesowych na profile uwalniania substancji. Na podkreślenie zasługuje fakt wykonania analizy kinetycznej przeprowadzonych procesów i wykazanie, że obie substancje uwalniane są zgodnie z modelem Higuchi. Doktorantka wykazała też, że dane uzyskane z wykorzystaniem mieszania lub wytrząsania są statystycznie różne od siebie ale we wszystkich eksperymentach uzyskano większą ilość uwolnionego leku podczas mieszania, w porównaniu do stosowania wstrząsania.

Kolejną część pracy stanowią studia nad właściwościami i polimeryzacją analogów dopaminy. W badaniach Doktorantka podjęła próbę zastąpienia grupy aminowej dopaminy grupą azydkową w kontekście przeprowadzenia procesu polimeryzacji nowopowstałej pochodnej. W oparciu o wyniki zaawansowanej analizy spektroskopowej potwierdzono budowę oraz strukturę otrzymanego związku. Następnie wykonano proces polimeryzacji związku i przeprowadzono analizę uzyskanego poli(dopaazydu). Doktorantka nie tylko dowiodła, że produkt ma cząstki o sferycznym kształcie, ale przede wszystkim wykazała, że rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika ma znaczny wpływ na rozpuszczalność otrzymanego związku. Fakt ten został trafnie wykorzystany do przeprowadzenia wnikliwej analizy spektroskopowej powstałego poli(dopaazydu), której rezultaty, wsparte obliczeniami DFT, pozwoliły Autorce na precyzyjne określenie struktury tego związku oraz zdefiniowanie oddziaływań wewnątrz- i między cząsteczkowych. Doktorantka przeprowadziła też testy pokrycia wybranych materiałów otrzymanym materiałem i wykazała, że jest on bardziej hydrofobowy niż polidopaminy, ale pokrycia otrzymane z jego wykorzystaniem są bardziej szorstkie. W nurcie badań nad polimeryzacją analogów dopaminy pozostają także prace w których Autorka podjęła się przeprowadzenia procesu polimeryzacji norepinefryny. Poza przeprowadzeniem samego procesu, kluczowy aspekt badań został położony na analizę produktów pośrednich polimeryzacji oraz struktury końcowego związku. Z wykorzystaniem różnych technik magnetycznego rezonansu jądrowego Doktorantka zidentyfikowała główne cząsteczki wchodzące w skład poli(norepinefryny), którymi okazały się utleniona forma norepinefryny, produkt cyklizacji norepinefryny, noradrenochrom oraz produkt dimeryzacji noradrenochromu. Chciałbym w tym miejscu podkreślić ogrom pracy jaki Doktorantka poświęciła na interpretację niełatwych zazwyczaj widm, a dodatkowo odnotować niezwykle wysoki i dojrzały poziom interpretacji danych oraz ich dyskusji, co przełożyło się na precyzyjne zdefiniowanie struktury powstałego związku. W pracy Doktorantka zdefiniowała też morfologię otrzymanych nanocząstek polinorepinefryny oraz zdefiniowała właściwości fototermiczne tego związku, które okazały się lepsze od właściwości polidopaminy.

Finalną część pracy stanowi Część eksperymentalna, w której Autorka przedstawiła opis stosowanej metodyki badawczej z uwzględnieniem syntez pochodnych doksorubicyny oraz innych nanomateriałów, opisem testów uwalniania leków, a także metodyką pokrycia wybranych materiałów polidopaminą oraz jej pochodnymi. W pracy zaprezentowano też opis stosowanych technik analitycznych oraz wykonanych testów i badań

biologicznych. Wszystkie procedury opisane są w sposób jasny i wyczerpujący, umożliwiając powtórzenie eksperymentów. Dodatkowo zaprezentowano stosowane w pracy krzywe wzorcowe oraz przedstawiono szczegółowe dane uzyskane w oparciu o wykorzystane modele kinetyczne. Jest to wartościowe uzupełnienie pracy wskazujące na samodzielność Doktorantki w realizacji badań.

W kontekście omówionych wyżej osiągnięć chciałbym podkreślić, że recenzowana rozprawa traktuje nie tylko o efektywnej syntezie nanoplateform do dostarczania leków np. w terapii antynowotworowej, ale stanowi także pogłębione studium nt. analogów dopaminy, reakcji jakim substancje te mogą ulegać oraz powstających w wyniku tych procesów pochodnych. Przedstawiony materiał, zarówno teoretyczny, jak i doświadczalny jest bogaty i zasługuje na wyróżnienie. Postawione cele badawcze zostały w pełni zrealizowane, a uzyskane zależności wnoszą istotny element nowości naukowej, dodatkowo o dużym znaczeniu praktycznym. Do najważniejszych osiągnięć rozprawy zaliczam:

- opracowanie systemu złożonego z jonów żelaza, pochodnej ksylenu, pochodnej deoksorubicyny, krzemionki, polidopaminy oraz cisplatyny jako układu o potrójnym działaniu terapeutycznym,
- zdefiniowanie profili uwalniania leków antynowotworowych o różnej charakterystyce z wytworzonych nanoplateform,
- przeprowadzenie polimeryzacji analogów polidopaminy oraz wnikliwą charakterystykę przeprowadzonych procesów oraz określenie struktury i właściwości powstałych układów.

Obowiązkiem recenzenta jest także wskazanie pewnych niedokładności, nieściśłości, bądź nieprecyzyjnych sformułowań oraz ocena merytoryczna rozprawy, która ma wskazać kwestie wymagające dokładniejszego wyjaśnienia. Chciałbym podkreślić, że praca jest napisana bardzo starannie, czytelnie i poprawnie językowo oraz stylistycznie, a ponadto wyróżnia się niezwykle estetyczną i starannie przygotowaną szatą graficzną. Choć Autorka nie ustrzegła się kilku błędów językowych, formalnych oraz edytorskich i stylistycznych to w żadnym stopniu nie utrudniają one odbioru pracy. Mam jednak kilka komentarzy, jak i uwag i pytań, które nasunęły mi się w trakcie lektury pracy, a które stawiam w celu doprecyzowania pewnych fragmentów i uzyskania odpowiedzi Doktorantki.

1. W pracy poruszono niezwykle aktualne zagadnienia do których odniesiono się w nowatorski sposób. Przeanalizowano też znaczną ilość materiału badawczego, jak i zebrano sporo danych. Prosiłbym zatem o odniesienie się Doktorantki, dlaczego jest współautorem tylko jednego artykułu naukowego. W mojej ocenie ilość zebranych danych, jak i ich potencjał publikacyjny jest znaczny, co powoduje, że ilość opublikowanych artykułów wydaje się bardzo ograniczona.
2. W części literaturowej (str. 42) Doktorantka używa terminów „na powierzchni PDA” oraz „w strukturze PDA”. Prosiłbym o jasne rozgraniczenie tych terminów i wskazanie których z nich jest bardziej odpowiedni w kontekście polidopaminy.
3. Na stronie 85 Doktorantka pisze „Proces syntezy NCPs został zoptymalizowany...”. Prosiłbym o uściślenie informacji w jaki sposób doktorantka optymalizowała proces? Czy wykorzystywane były jakieś modele do planowania eksperymentu lub oprogramowanie komputerowe? W części eksperymentalnej również nie ma informacji nt. optymalizacji procesu, stąd moja prośba o wyjaśnienie tych kwestii.

4. W trakcie analizy rozdziału 4.3.1 zrodziło się pytanie dlaczego w pracy nie zdefiniowano właściwości fototermicznych materiału NCP-4? Pozwoliłoby to pełniejszą charakterystykę finalnego systemu.
5. W rozdziale 5 Doktorantka wiele miejsca poświęca na przeanalizowanie wpływu sposobu prowadzenia testu uwalniania leku na jego efektywność i wykazuje, że mieszanie jest bardziej wydajne. Są to trafne spostrzeżenia, ale w pracy brakuje głębszej dyskusji i wyjaśnień dlaczego mieszanie ma przewagę nad wytrząsaniem i jakie zjawiska o tym decydują?
6. Autorka w niezwykle wnikliwy sposób przeanalizowała struktury poli(dopaazydku) oraz poli(norepinefryny). Brakuje jednak w pracy, poza testami pokrycia powierzchni, głębszej dyskusji i wskazania potencjalnych kierunków wykorzystania tych materiałów lub wykazania jakie dalsze analizy i testy powinny zostać wykonane celem pełniejszego zobrazowania potencjału tych materiałów.
7. Jedyny niedosyt w części eksperymentalnej budzi brak jasnych informacji nt. wartości i sposobu prezentacji błędu pomiarowego dla takich technik jak analiza termograwimetryczna czy potencjał dzeta. Stąd prośba do Doktorantki o uzupełnienie tych informacji.

Na koniec należy podkreślić, iż choć recenzowana praca jest wartościowym materiałem badawczym, to dorobek naukowy Pani mgr Moniki Szukowskiej pozostawia pewien niedosyt. Doktorantka jest współautorką jednego artykułu naukowego, jak i współtwórczynią 6 wystąpień konferencyjnych krajowych i międzynarodowych pod postacią posterów (4 wystąpienia), jak i wystąpień ustnych (2 wystąpienia). W dysertacji brak natomiast informacji nt. zaangażowania Doktorantki w realizację projektów naukowych, czy Jej udziału w szkoleniach, kursach, czy stażach naukowych. Stąd moja prośba do Doktorantki o ustosunkowanie się do tych kwestii i szersze przybliżenie aktywności naukowej, ze szczególnym odniesieniem się do kwestii ilości opublikowanych artykułów naukowych.

Recenzowana rozprawa prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy, zawiera znaczne elementy nowości naukowej, o dużym znaczeniu praktycznym, a wymienione powyżej uwagi polemiczne i pytania nie umniejszają bardzo wysokiej oceny recenzowanej pracy. Na uwagę w szczególności zasługuje szeroki zakres zrealizowanej pracy doświadczalnej oraz wieloaspektowe podejście do analizowanych zagadnień. Autorka wykazała się zdolnością prowadzenia studiów literaturowych, opracowania własnych metod służących do rozwiązania postawionego problemu, umiejętnością planowania eksperymentów i krytycznej oceny faktów, a także zaawansowanej interpretacji wyników badań oraz formułowania wniosków.

Na podstawie oceny rozprawy doktorskiej autorstwa Pani mgr Moniki Klaudii Szukowskiej zatytułowanej „Bioinspirowane materiały katecholowe - synteza, struktura i zastosowanie w nanomedycynie” oraz zawartej w dysertacji aktywności naukowej jednoznacznie stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia wszystkie wymogi ustawowe i zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim. Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM o przyjęcie pracy i przeprowadzenie dalszych etapów przewodu doktorskiego.

