

dr hab. Marta Ziegler-Borowska, prof. UMK
Zespół Chemii Medycznej
Katedra Chemii Biomedycznej i Polimerów
Wydział Chemii UMK
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń
email: martaz@umk.pl

Toruń, 02.02.2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr Moniki Kaludii Szukowskiej
pt. „Bioinspirowane materiały katecholowe - synteza, struktura i zastosowanie
w nanomedycynie”

Recenzja została sporządzona w odpowiedzi na pismo Dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu prof. dr. hab. Macieja Kubickiego z dnia 29 listopada 2023 r. w związku z prowadzeniem przewodu doktorskiego Pani mgr Moniki Kaludii Szukowskiej i powierzeniem mi funkcji recenzenta przez Radę Naukową Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM.

Rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Kaludii Szukowskiej, przedstawiona do recenzji została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem dr. hab. Radosława Mrówczyńskiego, prof. UAM. Praca dotyczy aktualnej tematyki i wpisuje się w nowoczesne trendy w chemii nanomateriałów i ich aplikacji medycznych.

Zastosowanie nośników leków czy systemów ich dostarczania pozwala rozwiązać wiele problemów dotyczących wchłaniania i dystrybucji substancji czynnej. Szczególnie korzystnym podejściem jest przejście do skali nanometrycznej mogące skutkować zwiększeniem dostępności biologicznej leku a także większą selektywnością terapii, co ma szczególne znaczenie w przypadku terapii chorób nowotworowych.

Konwencjonalne metody leczenia nowotworów obejmują resekcję guza oraz chemio- i radioterapię. Metody te niosą ze sobą pewne ryzyko jak również szereg skutków ubocznych znacznie obniżających jakość życia pacjenta. Obiecującym rozwiązaniem jest immunoterapia wykorzystująca układ odpornościowy i specyficzne wiązanie do odpowiednich antygenów w komórkach zmienionych nowotworowo zwiększając w ten sposób zdolność układu immunologicznego do identyfikowania, hamowania i zabijania tych komórek. Niestety jest to

metoda, która w dalszym ciągu wymaga głębszego zrozumienia mechanizmów oraz czynników wpływających na odporność przeciwnowotworową, pierwotną i wtórną ucieczkę immunologiczną oraz cechy immunologiczne guza specyficzne dla danego narządu. Ponadto konieczność spersonalizowanego leczenia podnosi koszt terapii tak, że w chwili obecnej staje się ona mało dostępna dla pacjentów. Dlatego uzasadnione jest poszukiwanie alternatywnych rozwiązań dla wspomnianych terapii konwencjonalnych w postaci nośników leków, co jest przedmiotem badań w szerokiej dziedzinie jaką jest nanomedycyna. Nauka ta obejmuje badania fizykochemiczne, biologiczne i inżynieryjne prowadzące do otrzymania struktur o rozmiarze od 1 do 500 nm. Zastosowanie nośników w tej skali pozwala min. na dystrybucję substancji czynnych, które są niewystarczająco rozpuszczalne, modyfikację ich celów, wzmocnienie interakcji z błonami komórkowymi, ominięcie barier narządowych i dostarczenie leku bezpośrednio do miejsca guza, umożliwiając w ten sposób wykorzystanie niższych dawek i uniknięcie szeregu działań niepożądanych. Takie podejście do terapii raka wątroby typu komórkowego (HCC) postanowiła zastosować Pani mgr Monika Szukowska w swoich badaniach.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma formę monografii, którą otwiera strona tytułowa, przedmowa, spis treści, wykaz publikacji i wystąpień konferencyjnych. W dalszej kolejności Autorka zamieściła streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów stosowanych w monografii. Niestety w streszczeniu Doktorantka popełniła błąd w nazwie sorafenibu, który zapewne jest błędem edytorskim jednak z obowiązku recenzenta jestem zmuszona zwrócić na niego uwagę.

Rozprawa została klasycznie podzielona na trzy główne części: część literaturową, dyskusję uzyskanych w ramach badań wyników oraz część eksperymentalną. Zaraz po części poglądowej Doktorantka zamieściła również zdefiniowany cel pracy. Ostatnim elementem rozprawy jest bibliografia obejmująca 277 pozycji literaturowych.

Część literaturową pracy stanowią trzy rozdziały (str. 27 – 67) wprowadzające w tematykę badań. Autorka omówiła metody syntezy oraz właściwości polidopaminy oraz jej analogów (dwa rozdziały) oraz przykłady nanonośników leków opartych na polidopaminie, polimerach koordynacyjnych i krzemionce (jeden rozdział). Pani mgr Monika Szukowska w staranny sposób opracowała tę część rozprawy. Na uwagę zasługuje tutaj dbałość o estetykę i przejrzystość zamieszczonych treści. Niestety Autorka nie ustrzegła się kilku niefortunnych

sformułowań takich jak „charakter polimeryczny”, „wydłużenie czasu krążenia ogólnoustrojowego” czy „załadunek leku” które moim zdaniem wynikają ze zbyt dosłownego tłumaczenia z języka angielskiego. Doktorantka również wymiennie stosuje termin „produktu pośredniego” i „produktu przejściowego” co wymaga wyjaśnienia.

Część obejmująca dyskusję wyników została poprzedzona, zdefiniowanymi w formie osobnego rozdziału pt. „Cele pracy”, założeniami i problemami badawczymi jakimi Doktorantka postanowiła zająć się podczas realizacji badań w ramach doktoratu.

Pierwszym i moim zdaniem głównym celem było opracowanie i zoptymalizowanie metody syntezy nanocząstek polimerów koordynacyjnych jako potencjalnych nośników leków przeciwnowotworowych w terapii skojarzonej. Postawiony cel Doktorantka zrealizowała przez syntezę pochodnej doksorubicyny (DOX-P), zawierającej ugrupowanie katecholowe zdolnej do tworzenia nanocząstek polimeru koordynacyjnego w obecności jonów żelaza (II) i ligandu dwukleszczowego. Strukturę pochodnej DOX-P potwierdziły widma ^1H , ^{13}C NMR a także widmo masowe. Na uwagę zasługuje wykorzystanie przez Panią mgr Monikę Szukowską właściwości wiązania hydrazonowego polegających na hydrolizie w środowisku kwasowym. Jest to podejście świadczące o bardzo dobrej znajomości procesów biochemicznych zachodzących w komórkach oraz różnicach w szlaku metabolicznym komórek nowotworowych w porównaniu ze zdrowymi. Takie rozwiązanie jest znane w farmakologii i powinno zapewnić selektywność terapii w stosunku do tkanki zmienionej nowotworowo.

Kolejnym krokiem było otrzymanie nanocząstek polimeru koordynacyjnego a następnie pokrycie ich powierzchni powłoką krzemionkową i polidopaminą. Podejście takie umożliwiło Doktorantce osadzenie na otrzymanym materiale drugiego leku cytostatycznego jakim była cisplatyna. Wszystkie materiały zostały scharakteryzowane a ich struktura potwierdzona. Rozmiar otrzymanych nanocząstek wyznaczony techniką DLS mieścił się w zakresie od 20 do 36 nm. Na tym etapie pracy cel został z powodzeniem zrealizowany.

Charakteryzując otrzymane nanocząstki Doktorantka wykorzystwała spektroskopię w podczerwieni oraz analizę termogravimetryczną. Szkoda jednak, że Autorka nie zamieściła także termogramów i widm zarejestrowanych dla doksorubicyny i cisplatyny w formie wolnej co pozwoliłoby na lepszą interpretację otrzymanych wyników.

Cechą wyróżniającą zaprojektowane i otrzymane przez Panią mgr. Monikę Szukowską nanomateriały, poza ich wrażliwością na zmiany pH, są ich właściwości fototermiczne. Wszystkie otrzymane nanocząstki powodowały wzrost temperatury otoczenia po naświetlaniu

promieniowaniem o długości fali odpowiadającej pierwszemu i drugiemu oknu terapeutycznemu. Na podstawie przeprowadzonych pomiarów Doktorantka wytypowała nanocząstki NCP-3 (pokryte polidopaminą) jako materiał rokujący w terapii fototermicznej. Zastanawia mnie jednak, dlaczego Autorka nie wykonała i nie przedstawiła wyników pomiarów dla nanocząstek z osadzoną cisplatyną (NCP-4).

Zakładając, że otrzymane nanomateriały mają stanowić swojego rodzaju podstawę do leczenia nowotworu na drodze terapii skojarzonej, konieczne było również określenie zdolności otrzymanych nanocząstek do uwalniania osadzonych czy związanych z nośnikiem substancji czynnych. Doktorantka wykonała badania uwalniania doksorubicyny metodą bezmembranową dla nanocząstek NCP-2 i NCP-3 w roztworach o pH 7,4; 5,5; 4,5. Ponadto w przypadku profilu uwalniania w pH 4,5 Autorka zastosowała dodatek glutationu, którego podwyższone stężenie obserwuje się w komórkach nowotworowych. To również świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do realizowanego tematu. W tym przypadku podobnie jak dla właściwości fototermicznych najlepsze wyniki Pani mgr. Monika Szukowska uzyskała dla nanocząstek NCP-3. Zabrakło jednak profilu uwalniania dla cisplatyny podobnie jak zbadania zdolności do wywoływania hipertermii przez materiał NCP-4. Jest to dość zastanawiające, ponieważ ze względu na potencjalne aplikacje medyczne materiał powinien być scharakteryzowany pod kątem obu substancji czynnych.

Rozdziałem zamykającym tę część rozprawy jest przedstawienie i omówienie wyników badań cytotoksyczności otrzymanych nanocząstek na komórkach linii HepG2. Doktorantka przedstawiła kompletne wyniki badań dla wszystkich materiałów: NCP-2, NCP-3 i NCP-4. Najbardziej obiecujące wyniki Pani mgr. Monika Szukowska otrzymała dla nanocząstek zawierających obie substancje czynne (NCP-4). Wykazywały one zdolność do hamowania proliferacji komórek w największym stopniu zarówno bez jak i z wywołaniem hipertermii.

Zebrane w tej części pracy wyniki Doktorantka podsumowała w rozdziale 4.5 potwierdzając jednocześnie, że pierwszy z zamierzonych celów został przez nią osiągnięty.

Kolejnym etapem badań w ramach przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej, który został również przez autorkę zdefiniowany jako jeden z celów była synteza nanocząstek mezoporowatej krzemionki z powierzchnią funkcjonalizowaną polidopaminą jako nośników doksorubicyny i sorafenibu. I tutaj od razu nasuwa się pytanie, dlaczego Doktorantka

postanowiła zmienić substancję czynną z cisplatyny zastosowanej w poprzednich układach na sorafenib, który w farmakoterapii stosowany jest doustnie. Otrzymane nanocząstki Autorka scharakteryzowała metodami podobnymi jak wcześniej otrzymane materiały. Wykonane analizy zostały jednak poszerzone o metodę BET pozwalającą na określenie powierzchni właściwej materiału oraz zdjęcia wykonane metodą Transmisyjnej Mikroskopii Elektronowej. I znów pojawia się pytanie, dlaczego Doktorantka nie wykorzystwała tych technik charakteryzując materiały NCP 2-4.

Skuteczność enkapsulacji leku Pani mgr. Monika Szukowska potwierdziła badając profil uwalniania substancji czynnych oraz wyznaczając parametry LE% i LC%. Ponadto doktorantka postanowiła sprawdzić czy metoda badania uwalniania substancji czynnej wpływa na otrzymany profil. Pomimo, że prawidłowe badanie uwalniania substancji czynnej z postaci leku jest ustandaryzowane i opisane np. w FP XI uważam, że należy docenić dociekliwość i dbałość Doktorantki o rzetelność otrzymanych wyników. Uwalnianie zarówno doksorubicyny jak i sorafenibu Autorka badała w różnych warunkach pH, w obecności glutationu lub bez jego dodatku a także z dodatkiem nadtlenu wodoru jako czynnika wywołującego stres oksydacyjny. Zastosowanie wyżej wymienionych warunków świadczy po raz kolejny o bardzo dobrej znajomości tematu w ujęciu biomedycznym. Zastanawia mnie jednak fakt, czy na wynik uzyskany dla uwalniania sorafenibu nie miała wpływu jego słaba rozpuszczalność w wodzie. Trudno jest ocenić uwalnianie tej substancji czynnej w warunkach stresu oksydacyjnego (dodatek H_2O_2) bez udziału glutationu i porównać otrzymane wyniki z profilem uwalniania, gdzie użyto tylko glutation zwiększający, jak zresztą zauważyła Doktorantka, rozpuszczalność sorafenibu. Otrzymane w tej części pracy wyniki Doktorantka również podsumowała w osobnym rozdziale 5.6.

Kolejnym materiałem otrzymanym przez Panią mgr. Monikę Szukowską były nanocząstki polimeru otrzymanego przez polimeryzację (2-azydoetylo)benzeno-1,2-diolu. Doktorantka opracowała i zoptymalizowała metodę syntezy monomeru, potwierdziła jego strukturę a następnie poddała reakcji polimeryzacji prowadzącej do poli(dopaazydku). Otrzymany polimer również został w pełni scharakteryzowany za pomocą dostępnych technik analizy instrumentalnej. Cennym elementem tego rozdziału pracy z punktu widzenia chemii polimerów jest analiza i dyskusja widm NMR poli(dopaazydku). Doktorantka dla otrzymanego polimeru w formie filmu wyznaczyła również wartości kąta zwilżania powierzchni wodą. Dostarcza to w prawdzie informacji na temat charakteru powierzchni materiału polimerowego

jednak mam pewne obawy co do wiarygodności wyników uzyskanych po czasie kontaktu z kroplą wynikające z faktu, że dla otrzymanego polimeru Doktorantka nie zbadała ani jego zdolności pęcznienia w wodzie ani jego stabilności w tym rozpuszczalniku.

Cennym elementem tej części pracy jest zbadanie wpływu ilości użytego w reakcji utleniacza na morfologię otrzymanych nanocząstek polimeru.

Rozdziałem, który budzi dużo moich wątpliwości co do zasadności jego zamieszczenia w pracy a także opisu i dyskusji otrzymanych wyników jest Rozdział 6.5 zatytułowany „Obliczenia DFT”. Autorka twierdzi, że „w obliczeniach DFT uwzględniono poli(dopaazydek)” z czym już na samym początku analizując struktury przedstawione na Rys. 82 nie mogę się zgodzić. Na wspomnianym rysunku przedstawione są dwa konformery: azydku dopaminy i odpowiedniego chinonu, co z resztą Doktorantka prawidłowo określiła w podpisie rysunku. Obliczenia wykonano z użyciem funkcjonału B3LYP/6-31** (Doktorantka popełniła błąd w nazwie nie umieszczając myślnika) w fazie gazowej. Moim zdaniem otrzymane struktury nie wnoszą istotnych informacji ani na temat geometrii azydku dopaminy i jego chinonu a w szczególności nie mówią nic o budowie polimeru czy chociażby oligomeru. Żeby otrzymać w miarę wiarygodne wyniki należałoby wykonać obliczenia dla oligomeru metodami dynamiki molekularnej. Ponadto zastanawia mnie otrzymana geometria struktur. Obie są niemal identyczne i zadziwiająco „w linii” podczas gdy obecność dość giętkiego fragmentu struktury pomiędzy pierścieniem aromatycznym a ugrupowaniem azydkowym sugeruje, że układ mógłby wykazywać tendencje do stabilizacji przez oddziaływania azydku z pierścieniem. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że jest to fragment będący niejako elementem dodatkowym pracy nie wymagam od Doktorantki głębszych wyjaśnień, uważając jednak, że w takiej formie i zakresie jest to najśłabsza część rozprawy, której moim zdaniem doktorantka z powodzeniem mogła nie zamieszczać.

Ostatnimi materiałami otrzymanymi przez Panią mgr. Monikę Szukowską w ramach prowadzonych przez nią badań były nanocząstki otrzymane na drodze polimeryzacji norepinefryny. Doktorantka opracowała i zoptymalizowała metodę syntezy tych nanocząstek, a następnie je scharakteryzowała. Szkoda, że otrzymane nanocząstki nie zostały wykorzystane przez Doktorantkę jako nośniki używanych wcześniej substancji czynnych. Powoduje to, że na tym etapie nie widać pewnej ciągłości badań. Bardzo ciekawym i cennym elementem jest próba wyjaśnienia mechanizmu i kierunku reakcji polimeryzacji norepinefryny za pomocą spektroskopii NMR. Wymagało to od Autorki szeregu analiz, dużego nakładu pracy

i dokładności w interpretacji uzyskanych wyników. Ta część pracy podobnie jak poprzednie podsumowana jest przez autorkę w osobnym rozdziale 7.5.

Podsumowując część „Dyskusja wyników” należy podkreślić, że Doktorantka zrealizowała wszystkie postawione sobie cele badawcze. Wykazała się znajomością metod syntezy i charakterystyki nanomateriałów. Ponadto udowodniła, że jest bardzo dobrze przygotowana do realizacji tematu i posiada dobry warsztat analityczny oraz umiejętność trafnego formułowania spostrzeżeń. Na wyróżnienie zasługuje dbałość Doktorantki o estetykę pracy i poprawność rysowania struktur organicznych.

Zabrakło moim zdaniem jednak podsumowania zbierającego w całość wnioski jakie Doktorantka mogła wyciągnąć na podstawie wszystkich przedstawionych wyników. Sposób podziału tej części pracy na odrębne rozdziały z podsumowaniem sprawia, że momentami umyka spójność tematyki, która niewątpliwie jest i mogła być bardziej wyeksponowana.

Ostatnia część rozprawy, do której nie mam większych uwag poza drobnymi błędami językowymi, to „Część eksperymentalna”, w której Doktorantka przedstawiła opisy metod syntezy, wymieniła stosowaną aparaturę oraz zamieściła tabele i krzywe wzorcowe.

Przedstawione powyżej uwagi i komentarze nie wpływają na moją pozytywną ocenę przedstawionej rozprawy, a wynikają z obowiązku recenzenta, dbałości o szczegóły oraz zainteresowań naukowych i chęci konstruktywnej dyskusji nad zagadnieniami zawartymi w monografii.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr. Moniki Klaudii Szukowskiej spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w myśl obowiązującej Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr. Moniki Klaudii Szukowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marta Hegler-Borowska