



Lublin, 9 czerwca 2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Pawła Misiaka  
z tytułem „Polimerowe nośniki leków na bazie N-izopropylakrylamidu zawierające  
ugrupowania steroidowe”, wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu w Białymstoku  
pod kierunkiem prof. dr. hab. Agnieszki Zofii Wilczewskiej**

Nowotwory uważane są dziś za jedno z najgroźniejszych chorób cywilizacyjnych. Wraz ze stałym wydłużaniem się długości życia, które prowadzone jest w dużym tempie i dodatkowo w ciągłym stresie oraz przy zwiększającym się skażeniu środowiska naturalnego, przewidywany jest znaczący wzrost zachorowań na choroby nowotworowe. Stanowi to jedno z kluczowych wyzwań dla współczesnej medycyny, farmakologii i chemii. Pomimo tego, że znane są i używane, z większą lub mniejszą skutecznością, leki przeciwnowotworowe, to ciągle poszukiwane są nowe związki chemiczne, które mogłyby znaleźć potencjalne zastosowanie jako substancje aktywne biologicznie stanowiące składniki takich leków. Wielkim wyzwaniem jest znalezienie takich substancji aktywnych, które wykazywałyby maksymalnie duży efekt terapeutyczny nie powodując jednocześnie skutków ubocznych, które w terapii nowotworów są szczególnie uciążliwe. W tym miejscu znajduje się pole do działania dla chemików zajmujących się syntezą polimerów. Nowoczesne podejście do terapii opiera się na tzw. inteligentnych systemach dostarczania leków (SDDS, z ang. Smart Drug Delivery System). Zawierają one - oprócz substancji aktywnej farmakologicznie (API) - dodatkowy składnik, który ma na celu zapobieganie niekontrolowanemu wyrzutowi API w organizmie pacjenta i spowolnienie jej uwalniania, a w idealnym przypadku – transport leku do miejsc zmienionych chorobowo i umożliwienie działania API tylko w tym obszarze organizmu. Jako nośniki leków bardzo dobrze sprawdzają się polimery. Dzięki szerokim możliwościom syntezy polimerów o różnorodnej budowie chemicznej i morfologii kształtu można zaprojektować takie materiały, które będą w specyficzny sposób reagować na zmianę temperatury, pH, działanie światła czy pola magnetycznego, i wykorzystać je jako inteligentne nośniki w SDDS. Rozprawa doktorska mgr. Pawła Misiaka wpisuje się w nurt syntezy efektywnych polimerów do zastosowań w SDDS i mieści się w głównym obszarze zainteresowań prężnie działającego zespołu prof. A.Z. Wilczewskiej. Doktorant postawił sobie za cel otrzymać polimery termowrażliwe na bazie N-izopropylakrylamidu, zawierające reszty cholesterylowe i grupowania diketonowe lub ketoestrowe. Badania realizował w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki „Preludium”, którego był kierownikiem, oraz grantów „Opus” kierowanych przez Panią Promotor niniejszej rozprawy.



Recenzowana rozprawa doktorska ma postać jednolitego tekstu napisanego w języku polskim, liczącego blisko 200 stron. Jej układ jest tradycyjny, zachowuje trzy zasadnicze części: wstęp literaturowy, część badawczą (obie części zakończone podsumowaniem) oraz część eksperymentalną. Praca zawiera wykaz skrótów, spis tabel, rysunków i schematów, a także spis cytowanej literatury, obejmujący 215 pozycji. W końcowej części pracy przedstawiony został dorobek naukowy Autora dysertacji.

Doktorant rozpoczyna od nakreślenia znaczenia podjętych badań i zwięzłego wprowadzenia czytelnika w tematykę rozprawy. Szczegółowe cele badań przedstawia po części literaturowej. Przegląd istniejącego stanu wiedzy Autor podzielił na trzy rozdziały. W pierwszym prezentuje polimerowe nośniki leków: poświęca uwagę formom tych nośników, krótko charakteryzuje micelle, liposomy i polimerosomy, hydrożele i nanocząstki. Zwraca uwagę na parametry charakteryzujące polimerowe nośniki leków, które bezpośrednio wpływają z jednej strony na biodystrybucję, czas cyrkulacji w organizmie, biodegradację, a z drugiej - na możliwość enkapsulacji substancji aktywnej. Słusznie zauważa, że pomimo dostępności różnych metod badawczych wykorzystywanych do charakterystyki polimerowych nośników, trudno jest dokonać porównania właściwości prezentowanych w literaturze materiałów. W rozdziale drugim Autor przedstawia istniejący stan wiedzy na temat polimerowych nośników leków, które zawierają w swojej strukturze pochodne cholesterolu. Wspomina też o metodach polimeryzacji rodnikowej, szczególnie podkreślając rolę polimeryzacji kontrolowanej typu RAFT w syntezie polimerów o dobrze zdefiniowanej strukturze chemicznej i średniej masie molowej. Rozdział ten Doktorant wzbogacił obszernym zestawieniem polimerowych nośników leków, które zawierają pochodne cholesterolu na końcach łańcuchów polimerowych oraz w łańcuchach bocznych. W ostatnim rozdziale części literaturowej Autor prezentuje polimery termowrażliwe bazujące na *N*-izopropylakrylamidzie (NIPAM) i ich zastosowania jako nośniki leków.

Przedstawione wprowadzenie literaturowe uważam za kompletne. Widoczne jest, że Doktorant swobodnie porusza się w przedstawionej tematyce, dobrze orientuje się w prezentowanych zagadnieniach i ma krytyczne podejście do podjętego problemu. Podczas lektury tej części pracy zabrakło mi jedynie choćby krótkiego odniesienia się do doksorubicyny – substancji, która została wybrana przez Doktoranta do enkapsulacji w otrzymanych polimerach i kopolimerach. Poza tym, w rozdziale 1.3 Autor stwierdza, że wprowadzenie cząsteczki leku do nośnika polimerowego wpływa na rozmiar cząstek nośnika, i dalej przedstawia kilka przykładów z literatury zwiększenia bądź zmniejszenia tych rozmiarów. Warto byłoby pokusić się o próbę wyjaśnienia takiego zachowania systemów polimer/lek.

Opis i dyskusję badań własnych Autor zawarł w części badawczej, którą podzielił na dwa rozdziały poświęcone syntezie homo- i kopolimerów termowrażliwych oraz otrzymaniu cząstek polimerowych z enkapsulowaną doksorubicyną. Doktorant postawił sobie za zadanie syntezę polimerów NIPAM zawierających ugrupowania cholesterylowe na końcach łańcucha lub jako podstawniki w głównym łańcuchu polimerowym. W obu przypadkach zastosował polimeryzację RAFT/MADIX, w której wykorzystał jako czynnik przeniesienia łańcucha samodzielnie otrzymany ditiowęglan cholesterylu lub ditiowęglan oznaczony jako Xa.



W podejściu pierwszym, w którym ugrupowania cholesterylowe znajdowały się na końcu łańcuchów polimerowych, otrzymał homopolimery NIPAM oraz homopolimery monomeru bazującego na styrenie posiadającego ugrupowania diketonowe oraz drugiego alifatycznego ketoestru, a także kopolimery wymienionych monomerów i NIPAM. W celu podwyższenia temperatury zmętnienia Doktorant otrzymał też kopolimery NIPAM z *N*-winylokaprolaktamem, ale ta ścieżka nie przyniosła oczekiwanych rezultatów i badania nie były kontynuowane. W drugim podejściu Autor opracował metodę syntezy kopolimerów NIPAM z akrylanem cholesterylu, dzięki której wprowadził ugrupowania cholesterylowe jako podstawniki do łańcucha głównego kopolimeru. Dodatkowo, pokusił się też o modyfikację tiowęglanowych grup końcowych polimerów, co umożliwiło ich znakowanie fluorescencyjne. Otrzymane materiały polimerowe Autor scharakteryzował wyznaczając m.in. średnie masy molowe, temperatury zmętnienia, temperatury zeszklenia, CMC czy średnice hydrodynamiczne. Na koniec Autor przedstawił interesujące i obiecujące wyniki badań biologicznych otrzymanych polimerów. Okazuje się, że zaproponowane materiały nie wykazują aktywności hemolitycznej i już same w sobie zmniejszają przeżywalność wybranych komórek nowotworowych. W ostatnim etapie badań Doktorant otrzymał nanocząstki polimerowe z syntezowanych polimerów łańcuchowych, a te które wykazały najlepsze właściwości zastosował jako nośniki doksorubicyny. Wynikiem przeprowadzonych prac było otrzymanie przez Doktoranta takich układów polimer/lek, które charakteryzują się rozmiarem, kształtem, potencjałem zeta i temperaturą zmętnienia odpowiednimi do zastosowania jako nośniki leków. Badania biologiczne *in vitro* tych układów na zdrowych i nowotworowych komórkach pokazują, że układy te mają duży potencjał zastosowania w tworzeniu terapii przeciwnowotworowej.

Za bardzo interesujący aspekt rozprawy uważam badania nad wpływem konstytucyjności łańcuchów kopolimerowych na ich właściwości fizykochemiczne i biologiczne. Widoczne jest, że schemat tych badań został dobrze przemyślany i zaplanowany, na co niewątpliwie wpłynęło doświadczenie Pani Promotor. Należy podkreślić, że Doktorant realizując badania wykazał się znajomością metod skomplikowanej syntezy organicznej oraz metod niezbędnych do charakterystyki materiałów polimerowych. Forma przedstawienia wyników i ich analiza świadczy o wysokich kompetencjach naukowo-badawczych Doktoranta.

Rozprawa została napisana w sposób staranny pod względem edycyjnym. Zamieszczone tabele, schematy i rysunki są przejrzyste i czytelne. Za dodatkowy atut rozprawy uważam atlas związków, który bardzo ułatwił poruszanie się po obszernej części badawczej pracy. Błąd wkradł się w podpisie schematu 3 (str. 37). Na str. 28 zamieszczony został wzór cholesterolu i jego obrazkowe przedstawienie: mimo że jest to schemat, to jednak lepiej wyglądałby z dorysowanymi grupami metylowymi, a na schematach 1 i 3 Autor niekonsekwentnie posłużył się zaproponowanym obrazkiem. Niestety, nie udało się Autorowi uniknąć błędów językowych, gramatycznych i interpunkcyjnych, a szczególnie literowych, ale nie będę ich przytaczać w recenzji.

Podczas lektury rozprawy nasunęło mi się kilka komentarzy i pytań:



1. Autor posługuje się terminami „polimeryzacja wolnorodnikowa” i wolne rodniki, podczas gdy IUPAC nie zaleca używania przymiotnika „wolne” w odniesieniu do rodników.
2. W pracy Autor operuje terminem (średnia) masa cząsteczkowa polimerów i podaje jej wartość w jednostkach g/mol; w takim przypadku powinien użyć terminu masa molowa.
3. Na str. 55 podana jest niewłaściwa nazwa systematyczna związku CholBr.
4. Na str. 56 Autor pisze: „pojawienie się grupy metylowej przy 1,56 ppm” – powinno być pojawienie się sygnału od grupy metylowej.
5. Czy Doktorant mógłby wyjaśnić dużą różnicę pomiędzy temperaturą zeszklenia polimeru 4 a pozostałymi polimerami 5-9? Jeśli to możliwe to proszę też podać Tg dla PNIPAM (3) otrzymanego na drodze polimeryzacji rodnikowej.
6. Co znaczy stwierdzenie „temperatura degradacji wzrasta” (str. 61)? Jaka dokładnie wartość temperatury została uznana za temperaturę degradacji?
7. W pracy Autor dyskutuje dwie temperatury przejść fazowych: temperaturę zmętniania (Tc) i zeszklenia (Tg). Pisząc w pracy o przejściu fazowym nie uściśla, które przejście ma na myśli (np. str. 65, 66). Podobnie, pisząc o dyspersyjności, nie precyzuje czy chodzi o dyspersyjność masy molowej czy rozmiarów cząstek (np. str. 66, 92).
8. Do badań Doktorant wybrał *N*-winylokaprolaktam „ze względu na zakres jego LCST” – proszę podać jaki to zakres.
9. Doktorant postanowił wprowadzić ugrupowania diketonowe i ketoestrowe do struktury kopolimerów w celu ich wzbogacenia w grupy funkcyjne zdolne do oddziaływania z enkapsulowanymi cząsteczkami leków. Nie zgadzam się ze stwierdzeniem, że w strukturze PNIPAM i kopolimerów z PNCVL „trudno doszukać się dostępnych miejsc interakcji”. Grupy karbonylowe i atomy azotu jak najbardziej mogą tworzyć oddziaływania międzycząsteczkowe z cząsteczkami leków o odpowiedniej strukturze chemicznej. Zaprezentowane na str. 116 wyniki enkapsulacji doksorubicyny w PNIPAM i kopolimerach z ugrupowaniami ketoestrowymi i diketonowymi nie potwierdzają postawionej hipotezy nt. roli czynników kompleksujących. Poza tym, dlaczego Doktorant wybrał akurat doksorubicynę do swoich badań? Zabrakło mi w pracy wzoru tego związku chemicznego.
10. Str. 74: Autor pisze „Kopolimery gradientowe Chol-P(Acaci-*grad*-NIPAAm)-X uzyskano poprzez polimeryzację RAFT monomeru (21)” – czy nie powinno być Chol-P(NIPAAm-*grad*-Acaci)-X?
11. Na jakiej podstawie Autor na str. 79 pisze o mono- lub wielomodalnym rozkładzie rozmiarów nanocząstek?
12. W tekście na str. 82 Autor odsyła do schematu 14, podczas gdy powinien to być schemat 17.
13. W jakim stanie skupienia występuje w temperaturze pokojowej monomer 35?
14. Na str. 85: Doktorant błędnie w tekście opisał syntezę kopolimerów 36-38.
15. Czy na rysunku 31A nie zostały zamienione opisy krzywych DSC kopolimerów 53-55?
16. Proszę wyjaśnić, co na rysunku 38 oznaczają wartości 0,05 i 0,1?



Przytoczone wyżej uchybienia nie obniżają mojej wysokiej oceny merytorycznej recenzowanej rozprawy. Stanowi ona oryginalne podejście do syntezy polimerowych nośników leków w postaci nanocząstek. Wyniki rozprawy zostały opublikowane w czterech artykułach, w których Doktorant jest pierwszym autorem, w czasopiśmie o wysokich współczynnikach oddziaływania, tj. w *Cancer Nanotechnology, Chemistry and Physics of Lipids, Polymers, International Journal of Nanomedicine*.

Podsumowując, z treści rozprawy wynika, że stanowi ona opis oryginalnego rozwiązania problemu naukowego, jak również wykazuje ogólną wiedzę Doktoranta w dyscyplinie naukowej nauki chemiczne i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Stwierdzam, że spełnione zostały wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i stawiam wniosek o dopuszczenie mgr. Pawła Misiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, mając na uwadze znaczący wkład uzyskanych przez Doktoranta wyników na rozwój badań podstawowych w obszarze projektowania architektury kopolimerów do celów konstruowania inteligentnych nośników leków, ogrom pracy eksperymentalnej wykonanej przez Doktoranta oraz posiadany dorobek naukowy zawierający aż 12 artykułów naukowych i 10 wystąpień konferencyjnych zwracam się także do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy.

Marta Cynochowska

