UNIWERSYTET MEDYCZNY
W BIAŁYMSTOKU
Zakład Chemii Organicznej
ul. A. Mickiewicza 2A, 15-222 Białystok

MEDICAL UNIVERSITY
OF BIALYSTOK
Department of Organic Chemistry
Mickiewicza 2A, 15-222 Bialystok

prof. dr hab. Marta E. Płońska-Brzezińska
Zakład Chemii Organicznej
Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii
i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok, 29.08.2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Dawida Szymczuka
zatytułowanej
„Polimerowe nośniki leków zawierające pochodne kwasu litocholowego"

Przedmiotem recenzji są badania naukowe, podsumowane w pracy doktorskiej mgr Dawida Szymczuka pt. *„Polimerowe nośniki leków zawierające pochodne kwasu litocholowego"*, wykonane pod kierunkiem prof. dr. hab. Agnieszki Wilczewskiej oraz dr Karoliny Markiewicz w Wydziale Chemii Uniwersytetu w Białymstoku. Obiektem zainteresowania naukowego pana mgr Dawida Szymczuka są hybrydy polimerowo-nieorganiczne oraz homo- i kopolimery zawierające pochodne kwasu litocholowego. Głównymi celami pracy naukowej mgra Dawida Szymczuka było (i) opracowanie metodologii otrzymywania polimerowo-nieorganicznych i polimerowych nośników substancji czynnych biologicznie zawierających pochodne kwasu litocholowego z wykorzystaniem polimeryzacji z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha; (ii) uzyskanie układów polimerowo-nieorganicznych i polimerowych zawierających pochodne kwasu litocholowego bez lub z substancją biologicznie czynną; (iii) analiza właściwości fizykochemicznych otrzymanych układów oraz (iv) ocena przydatności farmakologicznej wybranych układów *in vivo*.

Podejmowane problemy naukowe przez mgr Dawida Szymczuka są wymagające, a stawiane cele niezwykle ambitne, szczególnie w kontekście bardzo kompleksowego podejścia i konieczności wykorzystywania metod, wiedzy i umiejętności z różnych dyscyplin naukowych. Przykładowo, integracja materiałów magnetycznych i polimerowych w efektywne systemy dostarczania substancji biologicznie czynnych wiąże się z szeregiem wyzwań, które wymagają starannego rozważenia. Projektowanie i synteza hybryd polimerowo-nieorganicznych o charakterze magnetycznym jest bardzo złożona. Osiągnięcie pożądanej wielkości, morfologii i dystrybucji zarówno polimeru, jak i komponentów nieorganicznych jest trudne. Metody takie jak synteza *in situ* i modyfikacje powierzchni mogą prowadzić do zmienności charakterystyki otrzymywanych układów i wymagają skrupulatnej kontroli oraz optymalizacji. Ponadto zapewnienie kompatybilności między fazą organiczną i nieorganiczną przy jednoczesnym zachowaniu ich odpowiednich funkcjonalności stanowi istotną przeszkodę. Dalej, ze względu na dynamiczny charakter środowisk biologicznych, utrzymanie trwałości chemicznej hybryd magnetycznych jest skomplikowane. Dodatkowo, przy wykorzystywaniu tych hybrydowych układów jako nośniki substancji biologicznie czynnych, należy zadbać, aby uwalnianie tej substancji/leku z nośnika było kontrolowane, w odpowiednim

miejscu w organizmie, aby zapewnić skuteczność terapeutyczną bez przedwczesnego uwalniania. Ponadto właściwości magnetyczne nieorganicznych nanocząstek mogą prowadzić do agregacji, jeśli nie są odpowiednio stabilizowane, co prowadzi do zmniejszenia skuteczności stosowania leku i potencjalnej cytotoksyczności. Bezpieczeństwo hybryd polimerowo-nieorganicznych jest niezwykle ważne, szczególnie w przypadku ich stosowania do dostarczania leków w zastosowaniach klinicznych. Nadal istnieją obawy dotyczące biokompatybilności materiałów nieorganicznych, takich jak metale i tlenki metali, zwłaszcza w odniesieniu do ich potencjalnej cytotoksyczności. Przy wyborze polimerów należy uwzględnić ich produkty degradacji, które powinny być nietoksyczne i biokompatybilne. Konieczne są zatem, kompleksowe badania *in vitro* i *in vivo*, aby ocenić biodostępność oraz toksyczność tych hybrydowych systemów przed ich zastosowaniem klinicznym. Chociaż nanocząstki magnetyczne mogą teoretycznie zwiększać skuteczność celowania po poddaniu ich działaniu zewnętrznego pola magnetycznego, osiągnięcie skutecznego celowania magnetycznego *in vivo* jest często bardzo trudne. Zdolność pól magnetycznych do penetracji głębokich tkanek i skutecznego kierowania nanocząstek do wyznaczonych miejsc może być ograniczona przez bariery biologiczne, takie jak naczynia krwionośne czy tkanki. Skuteczność celowania magnetycznego zależy również od właściwości magnetycznych nanocząstek, które muszą być zoptymalizowane pod kątem wystarczającej reaktywności magnetycznej, a ta ma ścisły związek z ich rozmiarem, ponieważ ten znacząco wpływa na ich zastosowania terapeutyczne i diagnostyczne. Wszystkie te problemy, zostały w jasny i klarowny sposób przedstawione przez mgra Dawida Szymczuka w części literaturowej rozprawy doktorskiej. Stanowiło to, bardzo trafne uzasadnienie podjęcia przez Doktoranta tej tematyki badawczej.

Układ rozprawy doktorskiej mgr Dawida Szymczuka jest klasyczny. Tekst pracy, liczący prawie 200 stron, podzielony jest na część literaturową, opis stosowanych procedur i aparatury oraz część zawierającą wyniki badań własnych i dyskusję. Rozprawę doktorską zamyka rozdział dotyczący podsumowania i wnioski końcowe oraz streszczenie pracy. Całość jest poprzedzona spisem zastosowanych skrótów, wprowadzeniem do tematyki obejmujące przegląd literatury oraz celem pracy. Proporcje pomiędzy poszczególnymi częściami pracy są w mojej ocenie prawidłowe, a sposób omówienia wyników i podsumowanie bardzo zrozumiałe.

Zakres prac badawczych przedstawionych w pracy doktorskiej mgr Dawida Szymczuka jest bardzo obszerny, ponieważ do tej pory, wyniki są podstawą sześciu prac już opublikowanych związanych z tematyką doktoratu. W dwóch z nich mgr Dawid Szymczuk jest pierwszym autorem. Dane bibliometryczne dla tych publikacji wynoszą: współczynnik oddziaływania 26,5 punktów a liczba MNiSW wynosi 680 punktów. Jedna praca przeglądowa podsumowująca otrzymane wyniki jest w recenzji. Dodatkowo, Doktorant prezentował wyniki swoich badań naukowych na dziewięciu konferencjach krajowych i zagranicznych. W latach 2022 i 2024, odbył on dwa krótkoterminowe staże w Uniwersytecie Łódzkim, w Katedrze Chemii Organicznej oraz w Uniwersytecie Paula Sabatiera w Tuluzie, w laboratorium SOFTMAT, we Francji. Należy również dodać, że realizacja badań naukowych będących podstawą pracy doktorskiej mgra Dawida Szymczuka, była możliwa dzięki wsparciu finansowemu z Narodowego Centrum Nauki dwóch projektów, których promotor pracy prof. Agnieszka Wilczewska, była i jest kierownikiem.

Sposób podejścia do postawionego celu badawczego, realizacja eksperymentalnej części pracy oraz analiza wyników generalnie nie budzą moich zastrzeżeń. Dowodzą bardzo dobrego merytorycznego przygotowania Doktoranta do dalszej pracy naukowej. Całość pracy oceniam bardzo wysoko, w związku z tym w dalszej części recenzji, chciałabym skupić się jedynie na przedstawieniu moich uwag i wątpliwości lub podkreśleniu pewnych zagadnień, które należałoby w dalszej pracy naukowej mgr Dawida Szymczuka, która jest deklarowana, wziąć pod rozwagę.

Główna uwaga ogólna, która nasuwa mi się po przeczytaniu tej pracy, to brak skrupulatności mgr Szymczuka w precyzyjnym nazywaniu zjawisk, procesów czy materiałów. Jest to niezwykle istotne w pracy naukowej, szczególnie w końcowym etapie każdego zadania badawczego, kiedy intepretujemy otrzymane wyniki eksperymentalne podsumowując pewne etapy pracy naukowej. Formułujemy na tej podstawie wnioski, które są punktem wyjściowym i decydującym o dalszych kierunkach badań. W przypadku tej dyskusji naukowej jest to szczególne istotne, ze względu na sformułowane na początku cele, które dotyczą między innymi powiązania właściwości fizykochemicznych otrzymanych układów hybrydowych polimerowo-nieorganicznych i polimerowych, w których skala ma istotny wpływ na ich właściwości fizykochemiczne i biologiczne oraz w odniesieniu do ich potencjalnego zastosowania. Poprawna charakterystyka właściwości fizycznych oraz chemicznych materiałów nanostrukturalnych i polimerowych, decyduje o możliwości ich stosowania. Jeżeli pewne cechy zostaną błędnie zdefiniowane to w późniejszych etapach pracy naukowej będzie to rodziło niewątpliwie problemy w dalszym postępowaniu i opracowywaniu konkretnej metodologii.

Uwaga ta dotyczy między innymi, zamiennie stosowanych pojęć „nanocząstki" i „cząstki". Zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC), terminy „nanocząstki" i „cząstki" posiadają szczegółowe definicje, które podkreślają ich rozmiar, właściwości fizykochemiczne, w tym strukturalne. Nanocząstki definiuje się jako dyskretne cząstki o wymiarach mieszczących się w zakresie od 1 do 100 nanometrów. W niektórych źródłach podawana jest wartość 200 nm. Definicja ta obejmuje różne rodzaje materiałów i struktur, w tym metale, półprzewodniki, polimery i struktury węglowe. Należy jednak zaznaczyć, że stosowanie pojęcia „nanocząstka", wynika z tego, że rozmiar tych indywiduów w istotny sposób definiuje zmiany właściwości fizycznych i chemicznych w zależności od stosowanej skali. W skali „nano", nanocząstki mogą wykazywać właściwości, które znacznie różnią się od ich odpowiedników w skali masowej ze względu na zwiększoną powierzchnię w stosunku do objętości oraz efekty kwantowe. Założenia IUPAC gwarantują, że nanocząstki różnią się od większych skupisk lub agregatów, dla których właściwości wykazywane w skali „nano" przez te indywidua chemiczne, nie są zachowane w większej skali. Natomiast pojęcie „cząstka" jest stosowane w szerszym kontekście i odnosi się do każdego małego, zlokalizowanego obiektu, który można zidentyfikować jako odrębny od innych. Termin ten nie ogranicza się do określonej wielkości i może obejmować zarówno obiekty mikroskopijne (o rozmiarze kilku mikrometrów), jak i makroskopowe (o rozmiarach setek mikrometrów lub większych). Termin „cząstki" obejmuje szeroką gamę form, w tym cząstki elementarne, koloidy, aerozole oraz granulki i niekoniecznie implikuje unikalne właściwości charakterystyczne dla nanocząstek.

Biorąc pod uwagę, układy, którymi zajmował się w swojej pracy naukowej mgr Dawid Szymczuk, w niektórych przypadkach można stosować te dwa pojęcia zamiennie ale z niezwykłą ostrożnością.

Stosowanie pojęcia cząstka do nanocząstek z rdzeniem z tlenku żelaza jest niepoprawnym sformułowaniem. Nanocząstki z rdzeniami metalicznymi mają bardzo dobrze udokumentowane właściwości fizykochemiczne, które jednoznacznie wskazują, że wspomniane właściwości zależą od ich rozmiaru i struktury, co jednoznacznie dowodzi, że ich właściwości zależą od skali. I nie jest to tylko problem semantyczny tej pracy. Takie dowolne i zamienne stosowanie nazewnictwa przesunęło tę granicę różnych określeń na pojedyncze nanocząstki i cząstki oraz agregaty. Należało skrupulatnie rozgraniczać dyskusje otrzymanych wyników w odniesieniu do pojedynczej nanocząstki/cząstki i agregatów. Skoro rozmiar nanocząstek/cząstek determinuje ich właściwości fizykochemiczne, to należy rozróżnić rozmiar pojedynczej nanocząstki/cząstki od ich agregatów i intepretować to w odniesieniu do stosowanej techniki badawczej, która została wykorzystana na danym etapie badań do ich charakterystyki. Dodatkowo, w pracy określenie cząstka stosowane jest nawet do cząsteczek chemicznych typu doksorubicyna (DOX, przykładowo strona 130). Natomiast dla indywiduów polimerowych, należałoby rozważyć, czy do otrzymanych układów bardziej precyzyjne sformułowania, takie jak micela czy mikrosfera lub cząstka polimerowa (strona 138 – NPs_10, NPs_11, itd.), nie powinny być stosowane. Tym bardziej, że terminologia dotycząca „nanośników w terapii przeciwnowotworowej" została przedstawiona na Rysunku 4, gdzie takie układy zostały zdefiniowane. Wprawdzie to uogólnienie proponowane w naukach medycznych niekoniecznie odpowiada definicjom chemicznym, to mimo to, pojawia się tutaj rozróżnienie nanocząstek i miceli polimerowych. Skoro Autor pracy doktorskiej w jej części zajmuje się zagadnieniami dotyczącymi enkapsulacji leków (Rozdział 4), to zapewne w tym przypadku są to micele polimerowe, a nie nanocząstki polimerowe. Bardzo prawdopodobne jest, że rozmiar miceli polimerowej, nie wpływa na właściwości fizykochemiczne tego indywiduum w zależności od stosowanej skali.

W tym kontekście, dzięki uogólnieniom i zamiennym stosowaniu różnych pojęć, niektóre wyniki zostały błędnie zinterpretowane. Przykładowo, porównywanie obrazów zarejestrowanych z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) i obserwowana wielkość nanocząstek hybrydowych jest porównywana z rozmiarami agregatów tych samych nanocząstek w roztworze – wyniki otrzymane z wykorzystaniem techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Dodatkowo, pomiary DLS wykonywane są w różnych rozpuszczalnikach (różna polarność), czasami z dodatkiem różnych soli (bufor fosforanowy), czyli bez tej samej procedury przygotowania i opracowanej metodologii. W części eksperymentalnej nie określono, w jaki sposób otrzymane nanocząstki/cząstki polimerowe były przygotowywane. Czy były sonikowane w łaźni ultradźwiękowej (jak długo) i w jakich odstępach czasowych były wykonywane pomiary? Zawarto natomiast w pracy sformułowanie (strona 154), że „pomiary w zależności od potrzeb prowadzono w różnych rozpuszczalnikach i różnych stężeniach próbek". Bardzo niefortunne sformułowanie pod względem naukowym, ale jednocześnie sugeruje to, że nie stosowano tych samych warunków pomiarowych dla różnych układów, a otrzymane wyniki porównywano między sobą. Wszystkie zsyntezowane nanocząstki i cząstki w badanych rozpuszczalnikach tworzyły agregaty, więc opracowanie dokładnej metodologii wykonywania pomiarów zarówno DLS, jak i określaniu potencjału elektrokinetycznego (potencjału ζ) było tutaj kluczowe dla otrzymania porównywalnych wyników, które można interpretować w odniesieniu do zsyntezowanych układów i je między sobą porównywać.

Dodatkowo, uzyskane wyniki z DLS dla zsyntezowanych nanocząstek/cząstek były interpretowane w odniesieniu tylko i wyłącznie do rozmiaru jednej nanocząstki porównując uzyskane wyniki z obrazami zarejestrowanymi z wykorzystaniem TEM oraz analizy termograwimetrycznej (TGA) zsyntezowanych materiałów. Przykładowo, dla nanocząstek hybrydowych (seria MNP zawierających PLCAA2 i PHEA, Tabela 5, oraz seria MNP@PLCAA1 i MNP@PAA, Tabela 7) wyznaczono średnią średnicę hydrodynamiczną agregatów (pełna poprawna nazwa „średnia wartość DLS znormalizowanego rozkładu intensywności", a nie jak stosuje Doktorant w skrócie „rozmiar"). Wyznaczone wartości DLS zostały zinterpretowane w odniesieniu do analizy TGA tychże materiałów. Porównano zatem właściwość, która charakteryzuje powierzchnię otrzymanych nanocząstek/cząstek i jej oddziaływania z cząsteczkami rozpuszczalnika z trwałością termiczną zsyntezowanych materiałów (TGA), gdzie na podstawie zmiany zależności ubytku masy wraz ze wzrostem temperatury w pewnym zakresie temperatur i określonej atmosferze gazu, oszacowano ilość (masowo) materiału organicznego do nieorganicznego. Analiza TGA to typowa analiza ilościowa. Określenie średniej średnicy hydrodynamicznej nanocząstek/cząstek opiera się tylko i wyłącznie na określeniu średniej wielkości hydrodynamicznej układów, która jest związana z właściwościami chemicznymi powierzchni nanocząstek/cząstek, oddziaływaniem przyciągającym i odpychającym pomiędzy nimi oraz oddziaływaniem z cząsteczkami rozpuszczalnika. Jeżeli nawet znaleziono jakąś liczbową korelację pomiędzy tymi dwoma analizami (TGA i DLS) dla zsyntezowanych nanocząstek/cząstek, to jest to, tylko i wyłącznie, przypadkowe podobieństwo liczb.

Jedyną korelację, którą można zastosować dla technik DLS, TGA i TEM, to analiza obrazów TEM nanocząstek/cząstek w odniesieniu do pomiarów TGA dla tego samego układu. Stosunek masowy polimeru do rdzenia magnetycznego, przykładowo dla układu MNP@PHEA, który wynosi w przybliżeniu 1:3 (oszacowana masa PHEA wynosi 26,6%, Tabela 5), powinien mieć potwierdzenie w obrazie zarejestrowanym z użyciem TEM, gdzie dla pojedynczej nanocząstki MNP@PHEA powinniśmy zaobserwować grubość otoczki polimerowej około trzykrotnie mniejszą niż średnica rdzenia MNP.

Z kolei, interpretacja wyników otrzymanych z wykorzystaniem DLS powinna być przedyskutowana w odniesieniu do potencjału elektrokinetycznego (potencjał ζ), ale pod warunkiem, że jedna i druga wielkość została oszacowana w tym samym roztworze i w ten sam sposób – ściśle określona metodologia pomiaru. W układach, którymi zajmował się mgr Dawid Szymczuk, wyznaczano średnie rozmiary hydrodynamiczne agregatów o dyspersji koloidalnej, dla których, sposób przygotowania „próbki" oraz czas, w którym wykonywany był pomiar, jest niezwykle istotny. Głównie dlatego, że prawie wszystkie zsyntezowane układy, charakteryzują się niską trwałością koloidalną w wodzie, na co wskazują wartości potencjału elektrokinetycznego. Co oznacza z kolei, że sposób przygotowania oraz czas, w którym dokonywany jest pomiar, stanowią istotne parametry, które decydują o mierzonej wartości.

Kolejna uwaga dotyczy właśnie określania trwałości dyspersji zsyntezowanych nanocząstek i cząstek polimerowych. Cała dyskusja dotycząca trwałości dyspersji nanocząstek i cząstek polimerowych opiera się, tylko i wyłącznie, na oszacowanych wartościach średniej średnicy hydrodynamicznej agregatów bez uwzględnienia wartości granicznych potencjału elektrokinetycznego. Już słowo „hydrodynamiczny"

wskazuje, że jest to wielkość zmienna w zależności od warunków pomiaru. Te obostrzenia są kluczowe w interpretowaniu otrzymanych wyników eksperymentu.

Potencjał elektrokinetyczny, jest krytycznym wskaźnikiem trwałości układów koloidalnych, w tym nanocząstek i cząstek polimerowych. Wartość potencjału ζ wynosząca około ±30 mV jest powszechnie uważana za próg, który określa trwałość dyspersji koloidalnych. Wartości poza tym zakresem wskazują na zwiększoną trwałość. Cząstki o potencjale ζ większym niż +30 mV lub mniejszym niż -30 mV wykazują silne odpychanie elektrostatyczne, skutecznie zmniejszając prawdopodobieństwo agregacji i zwiększając trwałość dyspersji w danym roztworze. Nanocząstki/cząstki polimerowe o potencjale ζ większym niż ±30 mV są uważane za stabilne, natomiast te o potencjale ζ pomiędzy +5 mV a +15 mV wykazują bardzo ograniczoną trwałość w danym roztworze i łatwość do flokulacji lub sedymentacji. Należy również podkreślić, że na wartość potencjału ζ istotny wpływ ma skład jonowy i stężenie roztworu, a w szczególności obecność określonych jonów, które mogą znacząco wpływać na potencjał ζ cząstek (*J. Phys. Chem. C* **2016**, DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b02787; *Sci Rep* **2017**, DOI: 10.1038/s41598-017-02136-x; *Colloids and Interfaces* **2019**, DOI: 10.3390/colloids3040062). Jony w roztworze mogą adsorbować się na powierzchni cząstki (zmieniając ładunek powierzchniowy) lub modyfikować grubość podwójnej warstwy elektrycznej, wpływając tym samym na oszacowanie wartości potencjału ζ.

Także wnioskowanie, że obniżenie potencjału elektrokinetycznego od wartości przykładowo +12 mV dla MNP@NH_2 do -22 mV dla MNP@PHEA-FA, wskazuje na wzrost trwałości dyspersji tych nanocząstek w wodzie, jak wnioskuje Doktorant, nie jest prawdziwe. Wartość -22 mV sugeruje, że układ MNP@PHEA-FA nie tworzy trwałej dyspersji w wodzie, co w konsekwencji oznacza, że wielkość agregatów w czasie pomiaru zmienia się. Analogiczną analizę można przeprowadzić dla pozostałych układów. Oczywiście znane są z literatury odstępstwa od tej reguły. Przykładowo, kopolimery kwasu mlekowego i glikolowego wykazują na ogół ujemny potencjał ζ w zakresie od -10 do -30 mV, ale stwierdzono, że te szczególne układy wykazują pewną trwałość dyspersji tych kopolimerów w roztworze wodnym (*Journal of Nanomaterials* **2015**, DOI: 10.1155/2015/692672). Chociaż słowo „pewna trwałość" nie zostało dokładnie zdefiniowane przez autorów pracy. Podobnie, w badaniach dotyczących usieciowanych nanocząstek fibroiny, wyznaczona wartość potencjału ζ wyniosła około -20 mV. W tym przypadku również określono, że nanocząstki fibroiny tworzą trwałą dyspersję w roztworze, przy czym o stabilności tych układów decydowała bardziej przeszkoda przestrzenna niż odpychanie czysto elektryczne pomiędzy nimi (*Pharmaceuticals* **2020**, DOI: 10.3390/ph13050086). Być może zsyntezowane niektóre układy, opisane w tej pracy doktorskiej, będą również w pewnych warunkach wykazywały odstępstwa od ogólnie przyjętej reguły dla koloidów (±30 mV), ale należało to odpowiednio udowodnić, a otrzymane wyniki wyjaśnić.

W odniesieniu do ogólnych moich uwag sformułowanych powyżej oraz kilku innych wątpliwości pozwolę sobie na sformułowanie kilku pytań do dalszej dyskusji.

1. Proszę o krytyczne przeanalizowanie danych eksperymentalnych, dotyczących zsyntezowanych nanocząstek polimerowo-nieorganicznych i cząstek polimerowych w odniesieniu do ich trwałości koloidalnej, czyli wyznaczonych wartości potencjału elektrokinetycznego i wskazanie, które z nich mają potencjał w badaniach biologicznych, przykładowo jako nośniki substancji biologicznie czynnych. Proszę o wskazanie celu terapeutycznego czyli miejsca ich stosowania.

2. Wskaźnik DI dla DLS, to kwadrat odchylenia standardowego podzielony przez kwadrat średniej średnicy hydrodynamicznej agregatów. Proszę przeanalizować, przykładowo dla wartości zestawionych w Tabeli 5, wartość DI, z podanymi wartościami odchylenia standardowego dla średniej średnicy hydrodynamicznej agregatów.
3. Wskaźnik DI posłużył również Doktorantowi do określania dyspersyjności zsyntezowanych nanocząstek/cząstek i oceny przydatności zsyntezowanych układów w zależności od wartości DI (przykładowo strony 138 i 139). Tutaj, pojawia się wartość DI 0,3-0,4, określona przez mgr Dawida Szymczuka jako graniczna (brak danych literaturowych). Na stronie 141, Doktorant wprost twierdzi, że wskaźnik DI o wartości 0,43 dla układów oznaczonych NPs_14_DOX sugeruje „najwyższą dyspersyjność" tego układu, a w wyjaśnieniu dalej stosuje sformułowanie wręcz odwrotne, twierdząc, że układ jest mniej jednorodny. W tym samym akapicie: „W przeciwieństwie do niego, układ NPs_15_DOX, mimo niższego stężenia DOX, wykazywał korzystniejsze właściwości fizykochemiczne (DI=0,26; ζ=(-7.0) mV)". Po pierwsze nie określano właściwości fizykochemicznych tych układów, porównano jedynie dla dwóch cząstek polimerowych wskaźnik DI i potencjał elektrokinetyczny. Po drugie, wartości potencjału elektrokinetycznego dla serii cząstek homopolimerowych mieszczące się w zakresie od -11,2 do -4,2 mV (Tabela 9) wskazują, że układy te nie tworzą trwałej dyspersji w badanym rozpuszczalniku, co oznacza, że oszacowane wartości średniej średnicy hydrodynamicznej mogą być przypadkowe, ponieważ uzyskany wynik zależy chociażby, od czasu jego wykonania po przygotowaniu dyspersji. W związku z tym, proszę o odniesienie się do tych uwag i przeanalizowanie otrzymanych wyników w tym kontekście, zarówno dla homopolimerów jak i kopolimerów (Tabela 10).
4. Nawiązując również do zakresu badań omówionych powyżej, proszę o poparcie innymi danymi eksperymentalnymi wniosków o tym, że doszło do enkapsulacji DOX w miceli polimerowej lub polimery zostały kowalencyjnie zmodyfikowane DOX. Określanie średniej średnicy hydrodynamicznej nie jest dowodem na chemiczną modyfikację łańcucha polimerowego ani na enkapsulację DOX w miceli polimerowej.
5. W nawiązaniu również do tego etapu badań, proszę o przedstawienie i omówienie badań dotyczących spektrofluorometrycznego oznaczania DOX z układów homo- i kopolimerów. Interesuje mnie głównie sposób oznaczania stężenia DOX. Czy badano stężenie DOX zamkniętej w micelach polimerowych, czy uwalnianej DOX z miceli do roztworu? Jeżeli uwalnianej DOX do roztworu, to jaki czynnik został tutaj wykorzystany do uwalniania DOX? Czy w ramach prowadzenia badań nad uwalnianiem DOX, wyznaczono widma absorpcyjno-emisyjne dla DOX i formy unieruchomionej w miceli? Pytanie to jest niezwykle istotne z punktu widzenia oszacowania ilości uwolnionej substancji, a nie całkowitej ilości DOX w badanym roztworze.
6. W odniesieniu do sformułowania „pomiary w zależności od potrzeb prowadzono w różnych rozpuszczalnikach i różnych stężeniach próbek w zakresie od 0,2-2 mg/ml" oraz tego, że w pracy przedstawiono tylko wybrane wyniki dla stężenia 1 mg/ml, proszę o przedstawienie i omówienie jednej pełnej serii pomiarów dla jednego wybranego układu w pełnym zakresie stężeń 0,2-2 mg/ml.

Proszę o przeanalizowanie danych dla układu, dla którego wartość potencjału ζ, nie była niższa niż -15 mV.

7. Strona 130 i 131. W odniesieniu do zsyntezowanych układów i ich właściwości fluorescencyjnych, proszę o wyjaśnienie pojęć „przesunięcie wyznaczonego maksimum absorpcji świadczy o zmianie w otoczeniu chemicznym fluoroforu" lub „zmiana lokalnego środowiska fluoroforu". O jakich zmianach mówimy?
8. Dla badania aktywności hemolitycznej hybryd polimerowo-nieorganicznych (Rysunek 22) brak jest próby kontrolnej (5-FU) na przedstawionych wykresach. Proszę o wyjaśnienie na czym polega synergia stosowania 5-FU i hybryd polimerowo-nieorganicznych w tym przypadku. Czy 5-FU był dodany do medium czy hybrydy nieorganiczno-polimerowe zastosowano jako nośnik substancji biologicznie czynnej? Jakie było odchylenie standardowe przeprowadzanych badań i dla ilu powtórzeń wykonywane były pomiary aktywności hemolitycznej?
9. W odniesieniu do zagadnień powyżej, czy jest jakaś korelacja pomiędzy stosowanym stężeniem hybryd polimerowo-nieorganicznych i 5-FU a aktywnością hemolityczną? Przykładowo, czy wyznaczono parametry IC_{50} dla badanych układów? Co zadecydowało o wybraniu określonych stężeń badanych układów (10 i 100 μg/ml)? Uwaga do wniosku, który pojawił się w pracy jako punkt 4 (strona 94), który dotyczy tych właśnie badań. Nie wykazano, że wpływ budowy hybrydy polimerowo-nieorganicznej ma jakikolwiek efekt przeciwnowotworowy ani tym bardziej skuteczność terapeutyczną. Przedstawione wyniki dotyczą tylko i wyłącznie podstawowych badań *in vivo*, w okrojonym zakresie. Aby wyciągać tak daleko idące, bardzo optymistyczne wnioski, należy przeprowadzić badania z uwzględnieniem farmakokinetyki, w tym pobieranie komórkowe, biodystrybucję i okres półtrwania w krążeniu nanocząstek, a w końcowej fazie badania kliniczne.
10. Rozmiar nanocząstek znacząco wpływa na ich zastosowania terapeutyczne i diagnostyczne, co podkreśla Doktorant w części literaturowej. Chociaż optymalny rozmiar nanocząstek/cząstek można określić w odniesieniu do celów terapeutycznych, miejsca choroby i innych właściwości układów, niektóre kluczowe elementy można uogólnić do wszystkich celów (*Nanomedicine* (Lond.) **2016**, 10.2217/nnm.16.5). Nanocząstki muszą być większe niż 10 nm, aby ominąć barierę filtracji nerkowej. Te o średnicy większej niż 200 nm są szybko usuwane z krwiobiegu, gromadząc się w wątrobie i śledzionie. Modele termodynamiczne i badania eksperymentalne wskazują, że rozmiar około 50 nm jest optymalny do stosowania *in vivo*, ponieważ ten rozmiar gwarantuje tzw. „największy wychwyt komórkowy". Biorąc pod uwagę te wytyczne, należałoby zweryfikować hipotezy badawcze. Czy na tym etapie, Doktorant widzi jakieś optymalne rozwiązania i cele terapeutyczne (potencjalne zastosowanie) dla magnetycznych nanocząstek hybrydowych oraz cząstek polimerowych zsyntezowanych przez siebie? Czy są jakieś kierunki dalszych pomysłów na „projektowanie" i udoskonalenie zsyntezowanych układów mając w zamyśle cele terapeutyczne?

Pomimo tych kilku krytycznych uwag i wątpliwości, co należało w moim obowiązku jako recenzenta, moja ocena pracy badawczej wykonanej w ramach pracy doktorskiej mgr Dawida Szymczuka jest bardzo wysoka. Rozprawa doktorska mgr Dawida Szymczuka dotyczy bardzo interesujących zagadnień

naukowych. Biorąc pod uwagę poziom naukowy pracy, jej zakres oraz dorobek publikacyjny Doktoranta stwierdzam, że moja ocena jest pozytywna. ***Rozprawa doktorska odpowiada wymogom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2108 r. poz. 1668 z późn. zm.), dlatego wnoszę o dopuszczenie mgr Dawida Szymczuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego***.

Marta Płońska-Brzezińska

prof. dr hab. Marta E. Płońska-Brzezińska