IChF
Instytut Chemii Fizycznej PAN

Prof. dr hab. Volodymyr Sashuk
Kierownik Zespołu „Chemia w Ograniczonej Geometrii"
Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa
Email vsashuk@ichf.edu.pl
Tel. +48 22 343 2091

Warszawa, 26 sierpnia 2025

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

Przedłożona do mojej oceny rozprawa doktorska została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu w Białymstoku pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Zofii Wilczewskiej (promotor) oraz dr Karoliny Haliny Markiewicz (promotor pomocniczy). Tematyka dysertacji wpisuje się w szeroko zakrojone badania prowadzone od wielu lat w zespole promotora, koncentrujące się na projektowaniu i zastosowaniach polimerów funkcjonalnych. Praca dotyczy projektowania oraz syntezy organicznych i hybrydowych (organiczno–nieorganicznych) nanomateriałów zawierających pochodne kwasu litocholowego, rozważanych jako potencjalne nośniki substancji aktywnych stosowanych w terapii przeciwnowotworowej.

Zagadnienia związane z opracowaniem selektywnych systemów transportu leków przeciwnowotworowych stanowią jedno z kluczowych wyzwań współczesnej medycyny. Najistotniejszym problemem w tym obszarze jest brak pełnej swoistości działania leków syntetycznych, co prowadzi do uszkodzeń zdrowych komórek i silnych efektów ubocznych. Opracowywanie nowych nośników, zdolnych do kierunkowej dostawy leków, daje realną nadzieję na poprawę skuteczności terapii poprzez zwiększenie selektywności oraz ograniczenie toksyczności. Materiały otrzymane i opisane w niniejszej pracy, dzięki inkorporacji kwasu żółciowego rozpoznawanego przez błony komórkowe, wpisują się w te światowe tendencje badawcze i mogą potencjalnie przyczynić się do wzrostu efektywności stosowanych obecnie cytostatyków.

Dysertacja mgr Dawida Szymczuka została przygotowana w formie pisemnej, zgodnie z zapisami Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" (art. 187 ust. 3). Praca liczy 198 stron i obejmuje: stronę tytułową, podziękowania, spis treści, wykaz skrótów, wstęp literaturowy wraz z określeniem celu pracy, część poświęconą badaniom własnym oraz część eksperymentalną, streszczenia w języku polskim i angielskim (umieszczone nietypowo - w dalszej części rozprawy, a nie na początku), spisy rysunków, schematów i tabel (które, w mojej opinii, są elementem raczej zbędnym), a także dorobek naukowo-organizacyjny doktoranta (który mógłby znaleźć się w części początkowej) oraz obszerną bibliografię zawierającą 264 pozycje literaturowe.

Wprowadzenie do rozprawy w sposób klarowny i przekonujący zaznajamia czytelnika z problemem naukowym, jakim jest poprawa skuteczności terapii przeciwnowotworowych. Autor trafnie wskazuje na ograniczenia obecnie stosowanych metod leczenia oraz na możliwości ich przezwyciężenia dzięki wykorzystaniu polimerowych nośników leków opartych o pochodne kwasu litocholowego, jak również dzięki zastosowaniu nanocząstek tlenków żelaza jako rdzeni funkcjonalnych układów transportujących.

Część literaturowa została opracowana z dużą starannością i obejmuje szczegółowe omówienie budowy i właściwości kwasów żółciowych, ich metabolizmu w organizmach żywych, mechanizmów oddziaływania z błonami komórkowymi oraz potencjalnych działań terapeutycznych, w tym szczególnie w kontekście terapii nowotworowych. Następnie autor koncentruje się na polimerach zawierających w swojej strukturze kwasy żółciowe. Opisane zostały różne sposoby ich otrzymywania - zarówno z wykorzystaniem pochodnych wbudowanych w łańcuch główny, jak i w segmenty boczne polimeru czy też w bardziej złożone układy typu „meduza". Poszczególne podrozdziały uzupełniają zestawienia tabelaryczne, w których przedstawiono szczegółowe porównania właściwości uzyskanych materiałów, co stanowi mocny punkt tej części pracy.

Pewien niedosyt budzi jednak brak szerszego omówienia w przeglądzie literaturowym wykorzystania nanocząstek nieorganicznych, zwłaszcza tlenków żelaza, jako nośników leków, które stanowią istotny element części badań doktoranta. Włączenie takiej dyskusji pozwoliłoby lepiej osadzić badania własne w kontekście aktualnego stanu wiedzy. Ponadto autor wspomina, że polimeryzacja katalizowana metalami jest powszechnie stosowaną metodą syntezy polimerów z udziałem kwasów żółciowych - recenzentowi nasuwa się pytanie, czy ewentualne pozostałości katalizatorów metalicznych nie mogą w niektórych przypadkach zwiększać toksyczności omawianych nośników, co byłoby istotnym problemem z punktu widzenia ich potencjalnych zastosowań biomedycznych.

W części badawczej autor rozprawy przechodzi do opisu syntezy i charakterystyki struktur hybrydowych, w których polimer został zakotwiczony na powierzchni magnetycznych nanocząstek tlenków żelaza. Zastosowane podejście polegało na immobilizacji ditiowęglanowego makroczynnika przeniesienia łańcucha polimerowego, a następnie przeprowadzeniu reakcji polimeryzacji z udziałem wybranych monomerów - zarówno zawierających w swojej strukturze pochodne kwasu litocholowego, jak i pozbawionych tego motywu (w takim przypadku odpowiednią modyfikację kwasem wykonywano już na gotowym polimerze). Wolną grupę hydroksylową wykorzystano następnie do przyłączenia kwasu foliowego, rozpoznawanego przez receptory obecne zwłaszcza na powierzchni komórek nowotworowych.

W przypadkach, gdy monomer posiadał wolną grupę karboksylową, możliwe było dodatkowe sprzężenie polimeru z doksorubicyną - dobrze znanym lekiem o działaniu cytostatycznym. Otrzymane nośniki poddano badaniom cytotoksyczności wobec wybranych linii komórkowych nowotworów.

Autor wskazuje, że uzyskane hybrydy przyjmują postać aglomeratów nanocząstek, najprawdopodobniej powstających na etapie powlekania ich warstwą krzemionki wskutek procesów sieciowania. Tak znaczne powiększenie rozmiaru może istotnie wpływać na efektywność dalszej funkcjonalizacji powierzchni, ilość oraz dostępność zaadsorbowanych leków, a także na biodostępność całych układów. Nasuwa się pytanie, czy podejmowano próby modyfikacji procedury w celu ograniczenia lub wyeliminowania tego efektu ubocznego. Jeżeli zaś proces aglomeracji jest typowy i trudny do uniknięcia, warto byłoby wyraźniej to podkreślić. Zastanawiające jest również, czy nie można było zastosować alternatywnych metod modyfikacji powierzchni - np. z użyciem pochodnych katecholu - aby zapobiec aglomeracji.

Decyzję o wyborze tlenku żelaza jako rdzenia hybryd rozumiem w kontekście ułatwienia oczyszczania materiałów, jednak w pracy zabrakło pełniejszego wykorzystania jego właściwości magnetycznych, np. w aspekcie kontrolowanego dostarczania leków. Pewne niedoprecyzowanie widoczne jest także w przedstawieniu wyników pomiarów DLS - nie podano dokładnych danych liczbowych, które pozwoliłyby jednoznacznie ocenić rozrzut wielkości cząstek. Skoro autor podkreśla wagę wysokiej dyspersyjności nanomateriałów w kontekście terapii przeciwnowotworowych, to tego typu charakterystyka wydaje się wręcz niezbędna. Uzupełnieniem mogłyby być również analizy XPS, umożliwiające ilościową ocenę składu powierzchni, a także dokładniejsze obrazy mikroskopowe ukazujące warstwową strukturę powłok nanocząstek. W przypadku braku możliwości uzyskania większych zbliżeń pomocne byłyby proste zabiegi graficzne (np. zaznaczenia czy obrysy), które lepiej uwypukliłyby obserwowane elementy strukturalne.

W pracy odnotowano również zmiany w potencjale zeta, jednak nie zostały one powiązane z obecnością określonych grup funkcyjnych na powierzchni cząstek - takie zestawienie pozwoliłoby na pełniejsze zrozumienie otrzymanych wyników. Nie do końca jasne jest także, w jaki sposób lek oddziaływał z nośnikiem hybrydowym w przypadkach, gdy nie był kowalencyjnie związany z polimerem. Ponadto wspomniano, że nanocząstki do badań były przygotowywane na świeżo - pozostaje zatem pytanie, czy w czasie przechowywania zachowywały podobną wielkość i stopień aglomeracji, czy też ich właściwości zmieniały się w czasie.

W trzecim rozdziale części badawczej autor rozprawy opisuje syntezę oraz charakterystykę liniowych polimerów zawierających fragmenty kwasu litocholowego zarówno w łańcuchu głównym, jak i w bocznych. Podobnie jak w przypadku hybryd, zastosowano metodę RAFT, wprowadzając makroczynnik polimeryzacji poprzez grupę hydroksylową szkieletu steroidowego. Następnie dołączono fragment PNIPAAm, którego zadaniem było podwyższenie rozpuszczalności końcowego polimeru w środowisku wodnym. Usunięcie grupy ditiowęglanowej umożliwiło natomiast funkcjonalizację pierścieniem pirenu, co miało pozwolić na śledzenie losów polimeru w środowisku biologicznym. Autor pokazał także możliwość dołączenia drugiego znacznika fluorescencyjnego, będącego równocześnie substancją aktywną - doksorubicyny. W tym miejscu rodzi się jednak pytanie, dlaczego konieczne było zastosowanie aż dwóch fluoroforów do monitorowania lokalizacji polimeru w komórkach - aspekt ten nie został w pracy dostatecznie wyjaśniony.

W przypadku wprowadzania fragmentów kwasu litocholowego do łańcuchów bocznych polimeru, grupę hydroksylową poddano funkcjonalizacji grupą akrylową i poddano polimeryzacji z udziałem odrębnego makroczynnika RAFT. Dla poprawy rozpuszczalności, również i w tym wariancie wprowadzano dodatkowe segmenty PNIPAAm. Warto byłoby jednak rozważyć, czy obecność licznych grup karboksylowych (zwłaszcza w stanie zdeprotonowanym) nie zapewniała już wystarczającej rozpuszczalności w wodzie, co mogłoby czynić wprowadzenie PNIPAAm zbędnym lub przynajmniej mniej koniecznym. Podobnie jak w poprzednim wariancie, gotowe polimery dekorowano dwoma fluoroforami.

Autor pokazał również możliwość syntezy polimerów, w których fragment monomeru znajdował się po stronie grupy karboksylowej (rozdz. 3.3). Niestety część ta została potraktowana bardzo skrótowo, bez porównania z wcześniej otrzymanymi polimerami. Badano jedynie powinowactwo do warstw lipidowych, a na tej podstawie sformułowano wniosek, że lek może być efektywniej dostarczany do komórek patologicznie zmienionych niż do zdrowych. Nie do końca jednak jasne jest, jaki lek miał tu autor na myśli ani w jakiej postaci został on uwzględniony.

W końcowej części rozdziału otrzymane polimery przekształcono w nanocząstki metodą strącania w wodzie, aby zbadać ich potencjał jako nośników doksorubicyny - zarówno kowalencyjnie przyłączonej, jak i niewiązanej. W tym kontekście pozostaje niejasne, dlaczego do badań wykorzystano polimery 10 i 11, które nie były sprzężone z doksorubicyną - ich rola w porównaniach nie została wyjaśniona. Ponadto brak jest jednoznacznego określenia, czy uzyskane nanocząstki stanowią zwinięte w sferyczną strukturę pojedyncze łańcuchy polimerowe, czy raczej konglomeraty wielu makrocząsteczek.

Co więcej, w przypadku tych polimerowych nanonośników nie zastosowano - jak wcześniej w systemach hybrydowych - funkcjonalizacji kwasem foliowym. Powoduje to, że brakuje możliwości bezpośredniego porównania właściwości obu typów układów: całkowicie organicznych oraz hybrydowych, co ogranicza zakres i pełnię wniosków wynikających z całości badan.

Generalnie rozdział sprawia wrażenie niedokończonego. Choć autor podkreśla, że prezentowane nanonośniki są obecnie badane pod kątem właściwości biologicznych, brak pełnych wyników w tej części pozostawia pewien niedosyt - zwłaszcza że hybrydy oparte na nanocząstkach tlenków żelaza zostały scharakteryzowane w znacznie większym zakresie.

Na samym końcu warto podkreślić bogaty dorobek naukowy i organizacyjny kandydata do stopnia doktora. Jest on współautorem sześciu publikacji naukowych, w tym dwóch jako autor wiodący. Jedna praca została wysłana do redakcji, choć - moim zdaniem - dopóki nie zostanie przyjęta do publikacji, nie powinna być jeszcze uwzględniana w rozprawie. Kandydat uczestniczył w licznych konferencjach naukowych, zarówno jako autor posterów, jak i komunikatów ustnych. Odbył także kilkukrotne staże naukowe. Był wykonawcą w dwóch projektach badawczych OPUS, realizowanych pod kierunkiem promotora i finansowanych przez NCN. Warto także podkreślić jego działalność organizacyjną, związaną przede wszystkim z popularyzacją nauki w społeczeństwie, co w obecnych realiach - przy ograniczonych środkach finansowych na badania - ma szczególne znaczenie.

Generalnie praca została napisana bardzo dobrym, zrozumiałym językiem. Bardzo pozytywnie oceniam częste podsumowania rozdziałów i podrozdziałów, które ułatwiają czytelnikowi śledzenie toku badań i pozwalają na zachowanie spójnego obrazu całej rozprawy. Znalazłem jedynie kilka drobnych usterek językowych i edytorskich. Są to m.in. literówki: „rekacje" (str. 37), „węglug" (str. 40, 55, 65), „zwierający" (str. 46), „polimerów nawiercających" oraz „przeszkód sferycznych" (str. 62), „rekację" oraz „samaego" (str. 156), „przpuszczono" (str. 16). Na str. 70, w pierwszym zdaniu ostatniego akapitu, brakuje prawdopodobnie czasownika („są"), natomiast na str. 105 w zdaniu „...interakcji pochodnych kwasów żółciowych komórkami prawidłowymi oraz nowotworowymi biologiczną" zabrakło przyimka „z", a ostatni człon („biologiczną") wydaje się przypadkowy i należałoby go usunąć, gdyż w obecnej formie zdanie jest niezrozumiałe.

W części eksperymentalnej kilkukrotnie przybliżone stężenia zapisano jako C=~, co należałoby zastąpić zapisem $C\approx$. Mam także pewne wątpliwości co do poprawności stosowanych terminów, np. „samonanoemulgujące" czy „inteligentne systemy dostarczania leków" (str. 59). Te ostatnie nie posiadają

zdolności myślenia, uczenia się czy podejmowania decyzji - nie są więc „inteligentne" w ścisłym tego słowa znaczeniu. Bardziej trafne wydaje się stwierdzenie, że są to systemy, w których poprzez odpowiednie modyfikacje chemiczne zakodowano określony sposób działania w wybranym środowisku.

Na str. 106 pojawia się także opis reakcji, którą autor określa jako reakcję addycji bromku - w mojej ocenie nie jest to reakcja addycji, lecz acylowania. Ponadto brak jest ujednolicenia w zapisie grup etylowych w przedstawionych strukturach: przykładowo, w schemacie 27 występuje zapis „Et", w schemacie 22 - kreska-Me, natomiast w schemacie 36 zastosowano dwie połączone kreski (standardowy zapis graficzny grupy etylowej).

Podsumowując, mimo mojej momentami dość krytycznej oceny, uważam, że przedstawiona rozprawa doktorska stanowi wartościowe opracowanie naukowe. Praca prezentuje wysoki poziom merytoryczny, łączy elementy badań podstawowych z podejściem aplikacyjnym oraz zawiera oryginalne propozycje, które mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań. Autor wykazał się znaczną samodzielnością badawczą, umiejętnością krytycznej analizy literatury oraz właściwego doboru metod eksperymentalnych. Uzyskane wyniki wpisują się w aktualne kierunki badań w obszarze chemii polimerów, chemii medycznej oraz nanonauki, a także spełniają wymagania stawiane pracom doktorskim w świetle obowiązujących standardów naukowych.

W związku z powyższym, stwierdzając spełnienie wszystkich wymogów formalnych określonych w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" (rozdział 2, art. 187 ust. 1–4), wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie Pana mgr Dawida Szymczuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Volodymyr Sashuk