



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I KOMPOZYTÓW

Prof. dr hab. inż. **Elżbieta PAMUŁA**
Prodzikan ds. Nauki WIMiC

Kraków, 2 stycznia 2023

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. inż. Adriana DOMIŃSKIEGO
pt. "pH-czułe systemy kontrolowanego uwalniania związków
biologicznie aktywnych"
zrealizowanej pod kierunkiem Promotora
Dr. hab. inż. Piotra Kurcoka, Prof. CMPW PAN

Recenzja została opracowana na podstawie decyzji
Rady Naukowej Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych
Polskiej Akademii Nauk w Zabrzu z dnia 17 listopada 2022
oraz zlecenia Dyrektora CMPW PAN Prof. dr hab. Barbary Trzebickiej
nr 1715/2022 z dnia 22 listopada 2022

Metody leczenia pacjentów z chorobami nowotworowymi opierające się podawaniu bardzo dużych dawek chemioterapeutyków nie zawsze są skuteczne, przede wszystkim z uwagi na niską selektywność substancji biologicznie aktywnych w kierunku komórek nowotworowych. Jednocześnie klasyczna chemioterapia wywołuje poważne skutki uboczne, wyraźnie obniżając jakość życia pacjentów. Dlatego wciąż trwają prace nad opracowaniem nowych metod dostarczania leków przeciwnowotworowych, które nie powodowałyby uszkodzenia zdrowych komórek, tkanek i narządów ale byłyby w stanie dotrzeć do guza nowotworowego i wnikać selektywnie do komórek rakowych powodując ich unicestwienie.



WIMiC

Akademia Górniczo-Hutnicza | Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Katedra Biomateriałów i Kompozytów

al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, tel. +48 12 617 44 48, fax. +48 12 617 33 71
e-mail: epamula@agh.edu.pl, www.ceramika.agh.edu.pl
Regon: 000001577, NIP: 675 000 19 23

Pan mgr inż. Adrian Domiński w swojej rozprawie doktorskiej podjął się opracowania nośników leków przeciwnowotworowych, które docierałyby w okolice guza nowotworowego i preferencyjnie uwalniały substancję biologicznie aktywną w tkance nowotworowej i/lub wewnątrz komórek nowotworowych. Bazując na wiedzy o tzw. efekcie Warburga, iż komórki nowotworowe z uwagi na hipoksję metabolizują glukozę do mleczanu, co powoduje wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe zakwaszenie środowiska guza, doktorant postanowił opracować nośniki leków, które będą w stanie reagować na obniżone pH środowiska zewnętrznego. Ponadto wykazał, że możliwe jest nadanie opracowanym materiałom wielkości nanometrycznej, aby preferencyjnie mogły gromadzić się w tkance nowotworowej dzięki zwiększonej przepuszczalności sieci naczyń krwionośnych i retencji nanocząstek oraz z uwagi na utrudniony drenaż limfatyczny.

Podjęta tematyka ma zatem istotne znaczenie w kontekście wytwarzania nowej generacji nośników leków przeciwnowotworowych. Dlatego uważam, że wybór tematyki rozprawy doktorskiej jest jak najbardziej trafny, aktualny i w pełni uzasadniony.

Praca doktorska pana mgr. inż. Adriana Domińskiego została zredagowana w języku polskim, ma typowy układ i liczy aż 174 strony. Na początku znajduje się krótkie *Wprowadzenie*, które bardzo dobrze nakreśla tematykę pracy. Rozdział 2 to *Przegląd literatury* (50 str.). Rozdział 3 to *Cel i zakres rozprawy* (2 str.). W Rozdziale 4 (67 str.) umieszczono *Omówienie wyników badań*. Rozdział 5 to *Wnioski końcowe* (3 str.). Następnie jest Rozdział 6 zatytułowany *Część doświadczalna* (17 str.). Pracę kończy spis 315 pozycji literaturowych, z których większość pochodzi z ostatnich 10 lat oraz zestawienie dorobku naukowego doktoranta. Na końcu umieszczono streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim. Pracę charakteryzuje bardzo dobra proporcja pomiędzy częścią literaturową a doświadczalną.

Na początku dysertacji doktorant dokonał prezentacji stanu wiedzy na temat polimerowych systemów kontrolowanego uwalniania leków a więc miceli, polimerosomów, nanocząstek polimerowych, dendrymerów, koniugatów polimer-lek oraz hydrożeli. Bardzo dokładnie opisał budowę i funkcje nanocząstek polimerowych jako nośników leków w terapiach przeciwnowotworowych, kładąc nacisk zarówno na celowanie pasywne, tj. wykorzystujące efekty zwiększonej przepuszczalności naczyń wkoło guza i retencji nanocząstek oraz celowanie aktywne opierające się na wykorzystaniu przeciwciał. Dużo miejsca poświęcił czułym na poziom pH polimerom, które potencjalnie nadają się do dostarczania leków w odpowiedzi na kwaśne środowisko guza nowotworowego. Opisał też strategię tzw. PEGylacji, mającej na celu przedłużenie krążenia nanocząstek w krwiobiegu i przeciwdziałanie ich fagocytozie przez układ siateczkowo-śródbłonkowy. W tej części pracy znalazły też się informacje na temat polimerowych nanonośników czułych na temperaturę, światło, pole magnetyczne, reaktywne formy tlenu, poziom glutationu czy enzymy. Następnie opisano supramolekularne hydrozele typu gość-gospodarz na bazie cyklodekstryn oraz biodegradowalne poliestry i poliwęglany do lokalnego dostarczania leków. W części literaturowej nie zabrakło również informacji na temat polimeryzacji poliwęglanów i β -laktonów, co jest w pełni uzasadnione tematyką rozprawy doktorskiej.

Przegląd literatury został bardzo dobrze zredagowany i świadczy o tym, że doktorant porusza się ze swobodą w tematyce obejmującej chemię polimerów, nanotechnologię, zagadnienia dotyczące nośników leków i leczenia nowotworów. Zauważyłam w tej części dysertacji tylko kilka niefortunnych sformułowań, które podaję z obowiązku recenzentki, aby autor nie powielał ich w przyszłych swoich pracach. Przypuszczalnie używając terminu „cytoplazma obwodowa” (str. 14) autor miał na myśli płyn zewnątrzkomórkowy albo substancję międzykomórkową, używając terminu „nadzór immunologiczny” (str. 16) autor miał zapewne na myśli odpowiedź immunologiczną, zaś zamiast terminu „antyciała” (str. 20, 21)

powinien używać terminu przeciwciała czy też zamiast „...aby nanonośniki wchodziły do wnętrza komórki nowotworowej” (str. 26) lepiej byłoby użyć wyrażenia „...aby nanonośniki wnikały do wnętrza komórki nowotworowej”, zamiast „aluminium” (str. 57) w rozumieniu pierwiastka o symbolu Al powinien być użyty termin glin. Nieco dziwnie brzmią też zdania: „...tylko pięciu aktywnie celującym układom udało się dotrzeć do II fazy badań klinicznych” (str. 22) lub „...dwóm nanolekom czułym na endogenne bodźce tkanek nowotworowych udało się dotrzeć do II fazy badań klinicznych” (str. 24). Użycie strony czynnej w powyższych zdaniach sugeruje, że to same leki mają siłę sprawczą i docierają do kolejnych etapów badań klinicznych, a nie decydują o tym – na podstawie uzyskiwanych na każdym etapie wyników – badacze, firmy farmaceutyczne jednostki notyfikujące i urzędy rejestracji. Pomimo tych naprawdę niewielu niedociągnięć część literaturową pracy można polecić zainteresowanym jako kompendium najnowszej wiedzy na temat reagujących na bodźce nanometrycznych systemów dostarczania leków przeciwnowotworowych.

Cel i zakres pracy zostały właściwie sformułowane i nie mam do nich żadnych zastrzeżeń.

W dalszej części pracy przedstawiono wyniki badań nad trzema reagującymi na obniżenie pH systemami dostarczania leków przeciwnowotworowych.

Pierwszy system stanowiły micelle z mechanizmem zrzucania powłoki PEG otrzymane z diblokowego kopolimeru poli(glikol etylenowy-hydrazon-b-[R,S]-3-hydroksymaślan) (mPEG-hyd-aPHB), w których zaenkapsułowano glikokoniugaty 8-hydroksychinoliny. Prace obejmowały syntezę makroinicjatora monometoksy-PEG zawierającego wiązania hydrazonowe i grupy karboksylowe, który został wykorzystany do anionowej polimeryzacji z otwarciem pierścienia β -laktonu, wykazującego zdolność tworzenia miceli. Za duże osiągnięcie należy uznać uzyskanie miceli z mPEG-hyd-aPHB o takich właściwościach, że przy obniżonym pH (a więc w warunkach klinicznych odpowiadających obszarowi guza nowotworowego)

dochodziłoby do usuwania z nich otoczki PEG i uwalniania zaenkapsułowanego leku. Przeprowadzone badania w kontakcie z komórkami nowotworowymi i nienowotworowymi wykazały, że puste micelle nie są cytotoksyczne, zaś załadowane lekiem sprzyjają apoptozie komórek nowotworowych, gdyż zarówno szybciej się w ich otoczeniu rozpadają (z uwagi na obniżone pH środowiska) a także są preferencyjnie przez nie pochłaniane (z uwagi na glikokoniugację 8-hydroksychinoliny). Uzyskano więc system, który potencjalnie jest bardziej selektywny względem komórek nowotworowych a co za tym idzie pozwoliłyby w przyszłości na zastosowanie mniejszych dawek leków u pacjentów, co ograniczyłoby skutki uboczne i potencjalnie wpłynęło na lepszą efektywność terapii.

Drugi system stanowiły micelle utworzone z amfifilowego kopolimeru triblokowego: monometoksy-PEG tworzącego zewnętrzną otoczkę, poliwęglanu alifatycznego sfunkcjonalizowanego ugrupowaniem ketalowym i niskocząsteczkowego polihydroksymaślanu tworzących hydrofobowy rdzeń (mPEG-b-PKPC-oPH), w których zaenkapsułowano koniugaty 8-hydroksychinoliny z glukozą i galaktozą lub niemodyfikowaną doksorubicynę. Micelle te wykazywały zdolność pęcznienia przy obniżonym pH uwalniając zaenkapsułowane leki. Badania wykazały, że zmieniając wzajemny stosunek bloków w kopolimerze można sterować stabilnością miceli, ich podatnością na degradację i uwalnianiem leków. Badania *in vitro* wykazały, że micelle załadowane koniugatem 8-hydroksychinoliny z galaktozą wykazywały największą selektywność względem komórek nowotworowych, natomiast micelle załadowane doksorubicyną takiej selektywności nie wykazywały. Moim zdaniem jest to szczególnie ciekawe spostrzeżenie, które dowodzi, że w przypadku zwalczania komórek nowotworowych sprawdza się podejście synergiczne, w tym wypadku zarówno czułość nośnika na obniżenie pH środowiska jak i modyfikacja samego leku.

Trzeci opisany w dysertacji system to był supramolekularny hydrożel powstający w wyniku oddziaływań gość-gospodarz pomiędzy α -cyklodekstryną i łańcuchami od pH-czułych miceli PEG,

zaprojektowany w celu dostarczania dwóch leków: hydrofobowej doksorubicyny i hydrofilowego glikokoniugatu 8-hydroksychinoliny. Podobnie jak w przypadku poprzednich systemów dokładnie opisano syntezę i właściwości badanych układów oraz wykazano, że niezaładowane hydrożele nie są cytotoksyczne dla komórek zdrowych i nowotworowych. Leki z takiego hydrożelu uwalniały się szybciej w środowisku o niższym pH, co przypisano hydrolizie wiązań ketalowych z miceli oraz obniżeniu oddziaływań gość-gospodarz α -cyklodekstryna-PEG. Badania *in vitro* wykazały wzmocnienie efektu cytotoksyczności gdy stosowano jednocześnie oba leki ale w mniejszych dawkach. Jest to bardzo obiecujący wynik wskazujący, że w przyszłości taki sam efekt terapeutyczny będzie można uzyskać podając pacjentom znacznie mniejsze dawki leków.

Studiując dysertację nasunęło mi się kilka pytań do dyskusji w czasie publicznej obrony. Czy autor mógłby określić do leczenia jakich nowotworów można byłoby zastosować opracowane przez niego systemy dostarczania leków? Jakie drogi podania byłyby optymalne w każdym z tych przypadków? Czy wyznaczane były parametry reologiczne hydrożelu takie jak moduł zachowawczy (G') i moduł stratności (G''). Czy mierzona była wstrzykiwalność, a jeśli tak, to czy dochodziło do odtwarzania struktury żelu po wstrzyknięciu?

W rozdziale 5 – już skrótowo – zestawiono najważniejsze wnioski i osiągnięcia pracy. Świadczy to o dojrzałości badawczej i umiejętności syntetycznego ujęcia tematyki doktoratu przez kandydata do stopnia naukowego doktora. W rozdziale 6 opisano materiały i odczynniki wykorzystane w doktoracie, sposób prowadzenia syntez wszystkich polimerów oraz badań właściwości strukturalnych, fizykochemicznych i biologicznych.

Podsumowując pragnę stwierdzić, że praca doktorska pana mgr. inż. Adriana Domińskiego została zredagowana bardzo starannie zarówno pod względem językowym jak i edytorskim. Przytoczone niewielkie niedociągnięcia, w żaden sposób nie umniejszają mojej

wysokiej oceny merytorycznej recenzowanej pracy, zaś pytania stanowią zaproszenie do dyskusji naukowej i nie mają wpływu na moją wysoką ocenę recenzowanej pracy.

Na podkreślenie zasługuje też, że opisane w rozprawie wyniki zostały już opublikowane w czasopismach o dużym współczynniku oddziaływania (*Pharmaceutics*, *Polymers* i *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*), co oznacza, że już przeszły wnikliwy proces recenzji i zdobyły uznanie środowiska naukowego. Kandydat do stopnia doktora jest współautorem w sumie 12 publikacji w czasopismach z bazy JCR (w tym w 6 występuje jako pierwszy autor). Ponadto zaprezentował wyniki swoich badań w postaci 2 prezentacji ustnych i 12 plakatowych na konferencjach naukowych, z których większość miała charakter międzynarodowy.

Doktorant pracował jako wykonawca w projektach OPUS i H2020-MSCA-RISE-2020, a jako kierownik w dwóch projektach finansowanych przez CMPW PAN. Odbył też dwa zagraniczne staże naukowe. Nie ulega wątpliwości, że zarówno zakres prowadzonych badań i osiągnięte wymierne efekty świadczą, że pan mgr inż. Adrian Domiński wykazuje się wyróżniającą aktywnością naukową i może pochwalić się bardzo dobrym dorobkiem, jak na ten etap rozwoju naukowego. Z całą pewnością można stwierdzić, że jest on już doświadczonym i bardzo wartościowym młodym badaczem.

Chciałabym podkreślić, że dysertacja doktorska pana mgr. inż. Adriana Domińskiego pt. "*pH-czułe systemy kontrolowanego uwalniania związków biologicznie aktywnych*" w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w dyscyplinie nauki chemiczne w myśl obowiązującej Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2020 r. poz.85 z późn. zm) i w związku z tym wnoszę o jej przyjęcie oraz dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto praca: 1) jest bardzo bogata metodycznie, 2) stanowi przyczynek do poszerzenia wiedzy na temat metod syntezy czułych

na pH polimerów do zastosowań medycznych; 3) dostarcza nowych i wartościowych informacji na temat projektowania innowacyjnych nośników leków przeciwnowotworowych; 4) wskazuje, że pozyskana wiedza może być zastosowana praktycznie; 5) prezentuje wyniki, z których większość została opublikowana a więc przeszła wnikliwy proces recenzji w renomowanych czasopismach, a ponadto, 6) doktorant ze swobodą wykorzystuje różnorodne narzędzia badawcze stosowane nie tylko w naukach chemicznych, ale również w naukach biologicznych i medycznych. Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że praca doktorska pana mgr. inż. Adriana Domińskiego w pełni zasługuje na wyróżnienie.

