

Łódź, dnia 20-02-2026 r.

Dr hab. Sylwia Michlewska
Kierownik Pracowni Obrazowania Mikroskopowego
i Specjalistycznych Technik Biologicznych,
Wydział Biologii i ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódzki
e-mail: sylwia.michlewska@biol.uni.lodz.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Konrada Wróbla pt. „Zmodyfikowane dendrymery PAMAM jako skuteczne systemy transportu leków przeciwnowotworowych” wykonanej w Collegium Medicum Uniwersytetu Rzeszowskiego pod kierunkiem Prof. dr hab. inż. Stanisława Wołowca

Dysertacja przedstawiona do recenzji podejmuje istotną problematykę zastosowania nanocząstek polimerowych jako nośników leków przeciwnowotworowych. Tematyka pracy wpisuje się w jeden z priorytetowych kierunków współczesnej onkologii eksperymentalnej, jakim jest opracowanie skutecznych i selektywnych systemów dostarczania leków (ang. DDS – *drug delivery systems*). W pracy oceniono zdolność modyfikowanych dendrymerów PAMAM do przenoszenia leków przeciwnowotworowych do komórek docelowych.

Ocena struktury dysertacji

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska składa się z części opisowej będącej podsumowaniem załączonych w dalszej części publikacji. Zbiór obejmuje pięć prac oryginalnych opublikowanych w renomowanych czasopismach międzynarodowych: *Polymers*, *Cancers*, *Molecules*, *Biomaterials Advances* oraz *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Łączny Impact Factor zawartych w dysertacji publikacji wynosi 24,8, a liczba punktów MEiN osiąga wartość 490 punktów. Wszystkie publikacje znajdują się na liście Journal Citation Reports. Oświadczenia współautorów potwierdzają znaczącą rolę Doktoranta w realizacji badań, szczególnie w zakresie prac związanych z syntezą oraz charakterystyką strukturalną otrzymanych związków.

W rozdziale wprowadzającym zatytułowanym jako „Wstęp teoretyczny” Doktorant w sposób zwięzły przedstawia szereg informacji dotyczących biologicznych podstaw rozwoju nowotworów złośliwych. Szczególną uwagę poświęca patogenezie nowotworów, prezentując mechanizmy transformacji nowotworowej, rolę onkogenów i genów supresorowych, znaczenie zaburzeń apoptozy oraz proces powstawania przerzutów. Następnie koncentruje się na obecnym stanie wiedzy dotyczącym farmakoterapii wybranych nowotworów złośliwych, omawiając strategie leczenia glejaka wielopostaciowego, raka kolczystokomórkowego, raka piersi, ostrej i przewlekłej białaczki szpikowej oraz niedrobnokomórkowego raka płuca. W tym kontekście przedstawia kluczowe mechanizmy oporności na leki przeciwnowotworowe, omawiając zjawiska takie jak aktywne usuwanie leków z komórki przez białka z rodziny ABC, ograniczony transport komórkowy, rozkład enzymatyczny leków oraz rolę mikrośrodowiska guza.

Fragment dysertacji poświęcony dendrymerom PAMAM zasługuje na szczególne wyróżnienie. Doktorant przedstawia nie tylko podstawowe informacje dotyczące struktury tych nanocząstek, ale także szczegółowo omawia znaczenie i strategie ich funkcjonalizacji, mechanizmy poprawy biodostępności

leków oraz koncepcję ich pasywnego i aktywnego celowania z wykorzystaniem efektu EPR oraz cząsteczek adresujących. Prezentacja ta pokazuje głębokie zrozumienie przez Doktoranta podjętej problematyki.

W części opisowej dysertacji Doktorant przedstawia i uzasadnia hipotezę badawczą, zgodnie z którą dendrymery PAMAM generacji 2-4 zmodyfikowane poprzez przyłączenie cząsteczek takich jak R-glicydol, biotyna oraz D-glukoheptono-1,4-lakton mogą stanowić skuteczne nośniki dla leków przeciwnowotworowych oraz kombinacji wielolekowych, skutkując wzrostem aktywności przeciwnowotworowej otrzymanych koniugatów.

Ocena wkładu Doktoranta w realizację badań

Zasługującym na szczególne podkreślenie wkładem mgr Konrada Wróbla w realizację przedstawionej dysertacji jest całościowe opracowanie strategii syntezy chemicznej wszystkich badanych koniugatów dendrymerowych. Ta część pracy ma fundamentalne znaczenie dla całego projektu badawczego. Należy podkreślić, że Doktorant jest pierwszym autorem dwóch spośród pięciu publikacji na których bazuje rozprawa doktorska, co potwierdza jego istotną rolę w realizacji prezentowanych badań.

W pierwszej pracy, opublikowanej w czasopiśmie *Polymers*, Doktorant był odpowiedzialny za funkcjonalizację powierzchniowych grup aminowych dendrymerów PAMAM generacji 2 i 3 poprzez addycję R- i S- glicydolu. Przeprowadził kompleksową syntezę zarówno pochodnych zawierających R-glicydol, jak i S-glicydol, a następnie dokonał ich pełnej charakterystyki strukturalnej przy użyciu zaawansowanych technik spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego, obejmujących eksperymenty jednowymiarowe oraz dwuwymiarowe. Na podstawie analizy widm NMR zdefiniował dokładny skład cząsteczkowy otrzymanych koniugatów.

W drugiej pracy, opublikowanej w czasopiśmie *Cancers*, w której Doktorant występuje jako pierwszy autor, przeprowadził syntezę biotynylowanych dendrymerów PAMAM generacji 3, które następnie wykorzystał do przyłączenia leków (celekoksybu oraz symwastatyny), zarówno jako koniugatów jednolekowych, jak i kombinacji dwulekowej. Opracowano strategię aktywacji leków, z wykorzystaniem konwersji celekoksybu do pochodnej bursztynianowej poprzez reakcję z bezwodnikiem kwasu bursztynowego, natomiast w przypadku symwastatyny zastosowano aktywację z wykorzystaniem karbonyldiimidazolu. Przeprowadzono także blokowanie pozostałych wolnych grup aminowych poprzez przyłączenie R-glicydolu, którego wybór jako modyfikatora powierzchniowego został podyktowany wynikami uzyskanymi w pierwszej publikacji.

Trzecia praca, opublikowana w czasopiśmie *Molecules*, przedstawia syntezę koniugatów dendrymeru PAMAM generacji 4 z lekami stosowanymi w terapii raka piersi. Doktorant opracował metodę kowalencyjnego przyłączenia hydrofobowych leków przeciwnowotworowych takich jak paklitaksel, lapatinib oraz fulwestrant, zarówno jako koniugatów jednolekowych, jak i koniugatu zawierającego kombinację wszystkich trzech leków. Zastosowanie dendrymeru wyższej generacji pozwoliło na przyłączenie większej liczby hydrofobowych cząsteczek. Wszystkie otrzymane koniugaty zostały R-glicydylowane w celu poprawy ich rozpuszczalności w wodzie.

W czwartej publikacji, która ukazała się w czasopiśmie *Biomaterials Advances*, Doktorant zastosował alternatywną strategię funkcjonalizacji dendrymerów, wykorzystując α -D-glukoheptono-1,4-lakton jako modyfikator powierzchniowy. Przeprowadził syntezę koniugatów zawierających lapatinib i/lub fulwestrant, które następnie były testowane pod kątem ich aktywności względem komórek raka piersi o różnym statusie receptorowym.

Piąta praca, opublikowana w czasopiśmie *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, w której Doktorant pełnił funkcję pierwszego autora, przedstawia opracowanie metody syntezy koniugatów z wykorzystaniem wiązania fosforamidowego wrażliwego na zmiany pH. Doktorant przeprowadził szczegółowe badania walidacyjne, a następnie wykorzystał je do przyłączenia fosforanów obecnych w lekach przeciwbiałaczkowych – cytarabiny, fludarabiny oraz deksametazonu – do dendrymerów PAMAM generacji 3. Ta część pracy zasługuje na szczególne wyróżnienie, gdyż Doktorant nie tylko opracował nową metodę syntezy, ale także przeprowadził eksperymenty potwierdzające wrażliwość wiązania fosforamidowego na niskie pH. Dodatkowo wykazał stabilność tych koniugatów w środowisku wodnym o odczynie obojętnym, co potwierdza potencjał zaproponowanej strategii do opracowania systemów o kontrolowanym uwalnianiu leków w odpowiedzi na warunki mikrośrodowiska guza nowotworowego.

Charakterystyka fizykochemiczna wszystkich otrzymanych koniugatów obejmowała szczegółową analizę strukturalną metodami spektroskopii NMR i IR, a także oznaczenie średnicy hydrodynamicznej, indeksu polidispersji oraz potencjału zeta.

Ocena wyników badań biologicznych

Do realizacji celów badawczych zespoły współpracujących ośrodków zastosowały szeroką gamę zaawansowanych metod, które w pełni pozwoliły na ocenę potencjału terapeutycznego otrzymanych koniugatów.

Koniugaty przebadano na szerokim panelu linii komórkowych reprezentujących różne typy nowotworów złośliwych (glejak wielopostaciowy, rak koleczystokomórkowy, rak piersi, ostre i przewlekłe białaczki, niedrobnokomórkowy rak płuca) oraz na liniach komórek prawidłowych (keratynocyty, fibroblasty), co pozwoliło na ocenę selektywności działania związków. Wykorzystano kompleksowy zestaw metod badawczych obejmujący różne testy cytotoksyczności, analizę wychwytu koniugatów z przyłączonymi znacznikami fluorescencyjnymi, ocenę wpływu na apoptozę i cykl komórkowy. Wykazano, że modyfikacja dendrymerów PAMAM poprzez addycję R-glicydolu zwiększa selektywność ich wychwytu przez komórki nowotworowe w porównaniu do komórek prawidłowych, co może mieć istotne znaczenie dla opracowywania selektywnych strategii terapeutycznych.

Przyłączenie leków (celekoksybu i symwastatyny) do dendrymerów PAMAM G3 prowadziło do istotnego wzrostu aktywności przeciwnowotworowej. Najbardziej spektakularny efekt zaobserwowano dla koniugatu zawierającego kombinację obu leków.

Badania koniugatów PAMAM G4 z hydrofobowymi lekami (fulwestrant, lapatinib, paklitaksel) wykazały tendencję do tworzenia asocjatów, której nasilenie zależało od stopnia podstawienia dendrymeru hydrofobowymi cząsteczkami leków. Pomimo asocjacji koniugaty zachowały zdolność do internalizacji przez komórki *in vitro*, choć zjawisko to może stanowić istotne ograniczenie biodostępności w warunkach *in vivo* i wymaga dalszej optymalizacji stechiometrii. Koniugat zawierający lapatinib wykazywał kilkukrotnie wyższą toksyczność niż sam lek. Szczególnie istotne było odkrycie właściwości senolitycznych koniugatu z lapatinibem, który indukował apoptozę w komórkach poddanych senescencji indukowanej przez doksorubicynę.

Znaczenie naukowe i potencjał aplikacyjny

Przedstawiona rozprawa wnosi istotny wkład w rozwój chemii bioorganicznej, nanotechnologii, oraz farmakologii doświadczalnej. Opracowane przez Doktoranta strategie syntezy oraz kompleksowa charakterystyka strukturalna otrzymanych koniugatów dendrymerowych stanowią cenny materiał

metodyczny dla innych badaczy. Wykazanie, że funkcjonalizacja dendrymerów poliolami pozwala na skuteczne rozpuszczanie hydrofobowych leków w środowisku wodnym, ma istotne znaczenie praktyczne z perspektywy projektowania systemów dostarczania leków. Opracowanie metody syntezy z wykorzystaniem wiązania fosforamidowego wrażliwego na zmiany pH oraz wykazanie, że wiązanie to zapewnia kontrolowane uwalnianie leków w odpowiedzi na niskie pH przy jednoczesnej stabilności w środowisku obojętnym, stanowi oryginalny wkład w rozwój inteligentnych systemów dostarczania leków reagujących na specyficzne warunki środowiska lizosomów, a w szczególności mikrośrodowiska guza. Istotne znaczenie ma odkrycie właściwości senolitycznych badanych koniugatów.

Wyniki przedstawione w dysertacji mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w opracowaniu nowych terapeutyków o zwiększonej skuteczności i selektywności działania. Szczególnie obiecujące wydają się możliwości zastosowania opracowanych systemów w leczeniu potrójnie ujemnego raka piersi, glejaka wielopostaciowego oraz białaczek. Dodatkowo wykazana w pracy przydatność wykorzystania opracowanych koniugatów w leczeniu parazytoz wywołanych przez nicienie otwiera interesującą perspektywę repozycjonowania tych systemów do innych zastosowań terapeutycznych poza onkologią.

Uwagi i pytania do dyskusji

Przedstawiona rozprawa doktorska charakteryzuje się wysokim poziomem merytorycznym i metodologicznym. Niemniej jednak, w celu pełniejszego obrazu osiągnięć Doktoranta oraz lepszego zrozumienia niektórych aspektów przeprowadzonych badań, proszę o ustosunkowanie się do następujących kwestii:

- W publikacji dotyczącej koniugatów dendrymerów PAMAM generacji 4 z hydrofobowymi lekami zaobserwowano, że koniugat zawierający paklitaksel wykazywał niższą toksyczność wobec komórek nowotworowych niż sam lek, podczas gdy koniugat zawierający lapatinib był znacząco bardziej toksyczny. Jakie mogą być przyczyny tych odmiennych efektów? Czy zaobserwowane różnice mogą wynikać z odmiennej kinetyki uwalniania leków z dendrymerów?
- W kontekście wykazanych właściwości senolitycznych badanych koniugatów, czy przeprowadzono badania mające na celu identyfikację molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za ten efekt?
- Jakie dalsze kroki badawcze byłyby zdaniem Doktoranta najbardziej sensowne w kontekście translacji uzyskanych wyników do badań przedklinicznych? Czy planowane są badania *in vivo* na modelach zwierzęcych, które pozwoliłyby na ocenę farmakokinetyki, biodystrybucji oraz terapeutycznej skuteczności opracowanych koniugatów?
- Czy przeprowadzono lub planowane są badania dotyczące interakcji z białkami surowicy? Jaka droga podania koniugatów mogłaby być zaproponowana w ramach potencjalnego zastosowania terapeutycznego?
- Czy rozważano możliwość dalszej optymalizacji systemu poprzez wprowadzenie dodatkowych elementów funkcyjnych?

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Konrada Wróbla stanowi rzetelne, wartościowe i oryginalne opracowanie naukowe o charakterze interdyscyplinarnym, łączące elementy chemii organicznej oraz biologii komórki. Doktorant podjął się niezwykle ambitnego zadania, prawidłowo zaplanował pracę, uzasadnił podstawę merytoryczną prowadzonych badań, właściwie sformułował

i zrealizował cele badawcze, a z uzyskanych wyników wyciągnął szereg interesujących i wartościowych wniosków. Dysertacja jest doskonałym przykładem podejścia koncepcyjnego do wybranego problemu naukowego, w którym jasno zdefiniowana hipoteza badawcza została systematycznie weryfikowana poprzez realizację kolejnych, logicznie powiązanych ze sobą etapów badawczych. Praca wnosi istotny wkład w dotychczasową wiedzę w zakresie projektowania i syntezy systemów dostarczania leków, ich charakterystyki fizykochemicznej oraz oceny aktywności biologicznej.

Doktorant wykazał się wysokimi kompetencjami w zakresie syntezy organicznej, posługiwania się zaawansowanymi technikami spektroskopowymi, krytycznej analizy i interpretacji wyników oraz zdolnością do prowadzenia badań interdyscyplinarnych na styku chemii i biologii. Szczególnie istotny jest jego autorski wkład w opracowaniu innowacyjnej metody syntezy z kompleksową charakterystyką strukturalną wszystkich otrzymanych koniugatów, która stanowiła podstawę do oceny ich właściwości biologicznych. Umiejętność samodzielnego projektowania i realizacji złożonych syntez wieloetapowych, optymalizacji warunków reakcji oraz interpretacji uzyskanych wyników świadczy o dojrzałości naukowej Doktoranta oraz jego gotowości do samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny rozprawy, oryginalność przedstawionych wyników, ich potencjalne znaczenie aplikacyjne oraz spełnienie wszystkich wymogów formalnych określonych w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 poz. 742), wnoszę do właściwej Rady Dyscypliny Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie mgr Konrada Wróbla do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Jednocześnie, mając na uwadze wysoką wartość dysertacji, innowacyjny charakter opracowanej metody syntezy z wykorzystaniem wiązania fosforamidowego wrażliwego na zmiany pH, zastosowanie zaawansowanych metod spektroskopowych do pełnej charakterystyki strukturalnej otrzymanych koniugatów oraz znaczący wkład pracy w rozwój biomedycyny, zwracam się do Wysokiej Komisji o rozważenie wyróżnienia niniejszej rozprawy doktorskiej.

