

prof. dr hab. Tomasz Puzyn

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Julii Korzuch
pt. "Fullerenes – theranostic nanoparticles in anticancer therapy"

1. Wstęp

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Julii Korzuch pt. "Fullerenes – theranostic nanoparticles in anticancer therapy" wykonana została w Instytucie Chemii na Wydziale Nauk Ścisłych i Technicznych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, pod kierunkiem prof. dr. hab. Roberta Musioła. Badania przeprowadzone zostały w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (OPUS nr 2019/35/B/NZ7/02459) pt. „The [60]fullerene-based theranostic agent for pancreatic cancers treatment and diagnosis”.

Już na wstępie chciałbym podkreślić znane mi, duże osiągnięcia chemików z Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach w zakresie projektowania nanofarmaceutyków. W poprzednich latach miałem przyjemność recenzowania rozprawy doktorskiej dr. Pawła Nalepy oraz osiągnięć habilitacyjnych dr. hab. Macieja Serdy, prof. UŚ w tym zakresie.

2. Ocena formalna

Praca liczy 149 stron i ma formę zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, czyli tzw. „spinki”. Składa się z przedruków sześciu oryginalnych prac w języku angielskim. Dwie z tych prac (pierwsza i trzecia) opublikowane zostały w *ACS Biomaterials Science & Engineering* (IF_{5-letni} = 5,5), a pozostałe w: *Scientific Reports* (IF_{5-letni} = 4,3), *International Journal of Nanomedicine* (IF_{5-letni} = 7,7), *Drug Discovery Today* (IF_{5-letni} = 8,1) oraz *Nanomedicine* (IF_{5-letni} = 4,4). Są to wiodące czasopisma, zakwalifikowane przez *Web of Science* do pierwszego lub drugiego kwartyła w swojej kategorii tematycznej. Należy więc założyć, że wszystkie manuskrypty przed publikacją przeszły wnikliwy proces oceny z udziałem zagranicznych recenzentów. Znacznie ułatwiło mi to przygotowanie niniejszej recenzji.

W dwóch pracach (oznaczonych nr 2 i 4) mgr Korzuch jest pierwszą autorką (uwzględniając informację o równym wkładzie dwóch pierwszych autorów w pracy nr 4), w dwóch (oznaczonych nr nr 5 i 6) – drugą autorką, w pracy nr 3 – trzecią autorką i w ostatniej pracy (nr 1) – czwartą autorką. Wspominam o kolejności, ponieważ zwyczajowo odzwierciedla ona wkład poszczególnych autorów w powstanie publikacji. W przypadku prac wieloautorskich, a szczególnie wtedy, gdy doktorant/doktorantka nie jest pierwszym autorem, należy przeanalizować czy jego/jej wkład spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w Art. 187 ust. 1. i 2. Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20 lipca 2018 r. z późniejszymi zmianami (zwanej dalej: Ustawą). Dużym ułatwieniem dla mnie w tym zakresie było dołączenie szczegółowych oświadczeń o wkładzie mgr Julii Korzuch oraz pozostałych współautorów w powstanie prac (choć nie jest to *explicite* wymagane przez Ustawę).

Oryginalne publikacje zostały dodatkowo opatrzone siedemdziesięciojednostronicowym komentarzem autorskim w języku polskim oraz streszczeniami: w języku polskim i angielskim. Formalna strona rozprawy spełnia zatem wymogi opisane Ustawie.

3. Ocena merytoryczna

Nadrzędnym celem badań mgr Julii Korzuch była synteza oraz funkcjonalizacja rozpuszczalnych w wodzie pochodnych fulerenu C_{60} pod kątem pięciu możliwych zastosowań w terapii nowotworów. Były to:

- fotouczulacze w terapii fotodynamicznej,
- wektory do transfekcji małych interferujących cząsteczek RNA (siRNA) w terapii genowej,
- znaczniki fluorescencyjne w obrazowaniu komórek rakowych,
- inhibitory kinazy tyrozynowej Burtona (BTK),
- nośniki teranostyków w terapii nowotworów (w tym przypadku erlotinibu, ERL).

Dodatkowo, celem jednej z prac był krytyczny przegląd literatury dotyczący oddziaływań fulerenów z białkami.

Jednym z najczęściej wykorzystywanych obecnie w terapii nowotworów typów nanocząstek są nanocząstki lipidowe. Praca Doktorantki – co zasługuje na szczególne podkreślenie – wpisuje się w najnowsze trendy badań pokazujące przewagę pochodnych fulerenów w stosunku do nanolipidów ze względu na ich niższą toksyczność i większą hydrofilowość, co umożliwia tworzenie stabilnych kompleksów oraz lepszą ochronę przed nukleazami.

W swojej pracy mgr Julia Korzuch wykorzystywała opisaną w latach 90. ubiegłego wieku niezależnie przez Bingla i Hirscha reakcję cyklopropanowania z wykorzystaniem podójnych wiązań C=C na powierzchni fulerenu w celu otrzymania czystych, mono- i heksakis-adduktów fulerenowych. Wykorzystując fakt, iż podstawowymi substratami do reakcji Bingla-Hirscha są maloniany, w pierwszym etapie syntezy pochodnych fulerenów Doktorantka przyłączała pożądane grupy funkcyjne do kwasu malonowego lub jego estrów, wykorzystując m. in. sprzęganie z użyciem karbodiimidów, amidację z chlorkami malonoilu, reakcję dimetylomalonianu z aminami oraz estryfikację katalizowaną przez kwas p-toluenosulfonowy. Uzyskane w ten sposób pochodne mogą służyć jako związki pośrednie w dalszych reakcjach. Metodyka wykorzystana w pracy czerpie zatem z najnowszych osiągnięć syntezy organicznej wykorzystywanej obecnie w chemii materiałowej, chemii medycznej oraz nanotechnologii.

Do najważniejszych osiągnięć prac badawczych mgr Julii Korzuch przedstawionych w rozprawie zaliczyłbym:

- syntezę pochodnych malonianu z zastosowaniem zoptymalizowanych warunków reakcji, w tym sprzęgania amidowego, estryfikacji i aminolizy,
- syntezę mono- i heksakisadduktów fulerenowych przy użyciu reakcji Bingla-Hirscha,
- syntezę fulerenów podstawionych etylenodiaminą i butyldiaminą, co umożliwiło dalszą koniugację z erlotynibem,
- przyłączanie erlotynibu do odpowiednich aminofulerenów poprzez fragment alkinowy, z wykorzystaniem cykloaddycji Huisgena 1,4,
- charakterystykę spektralną w celu potwierdzenia budowy otrzymanych produktów przy użyciu spektroskopii protonowego rezonansu magnetycznego (^1H NMR), spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego węgla C^{13} (^{13}C NMR), spektroskopii UV-VIS, spektroskopii podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR), rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS) i spektrometrii mas z jonizacją elektrosprayową (ESI-MS). Dotyczyło to pochodnych malonianu, mono- i heksakisadduktów, zmodyfikowanego erlotynibu oraz aminofulerenów sprzężonych z erlotynibem.

Uzyskane przez Doktorantkę pochodne fulerenu były dodatkowo charakteryzowane przez współpracowników. Scharakteryzowano rozmiar i stopień agregacji przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) i metody dynamicznego rozpraszania światła (DLS) oraz ładunek – przy pomocy pomiaru potencjału zeta.

Sukces projektu potwierdziły ostatecznie przeprowadzone we współpracy z kilkoma ośrodkami naukowymi badania aktywności biologicznej w kontekście wymienionych wcześniej zastosowań terapeutycznych. Między innymi pokazano, że prawie wszystkie (z wyjątkiem azidoamino- C_{60}) otrzymane pochodne fulerenów występowały jako pojedyncze izomery, przenikały błony komórkowe i lokalizowały się głównie w lizosomach. Nie wykazywały cytotoksyczności w ciemności (potwierdzone *in vitro* i *in vivo*). Ponadto, amino- i glikofulereny działały jako fotosensybilizatory: były nietoksyczne w ciemności, a po naświetlaniu niebieskim laserem stawały się cytotoksyczne. Obecność albuminy wzmacniała ten efekt. Hexakisamino C_{60} tworzył stabilne kompleksy z siRNA i skutecznie dostarczał je do komórek nowotworowych. Wykazano aktywność pochodnych fulerenów wobec kinaz tyrozynowych: HDGF hamował BTK, C_{70} BUT i $Gd@C_{82}$ -ERL wykazywały inhibicję EGFR.

Po lekturze rozprawy oraz oświadczeń poszczególnych współautorów nie mam najmniejszej wątpliwości, że przedstawione przez mgr Julię Korzuch wyniki stanowią oryginalny wkład w rozwój nauk chemicznych, szczególnie w zakresie chemii medycznej i jej wykorzystania w obszarze terapii antynowotworowych z użyciem nanocząstek. Cały projekt, kierowany przez dr. hab. Macieja Serdę, prof. UŚ, stanowi przykład wzorowo zaplanowanych interdyscyplinarnych badań, w których poszczególni badacze mają do odegrania ważną rolę, w pełni wykorzystującą ich unikalną wiedzę i umiejętności.

Lektura części teoretycznej komentarza autorskiego oraz pracy przeglądowej dodatkowo upewniła mnie w przekonaniu, że mgr Julia Korzuch posiada rozległą wiedzę zarówno w dyscyplinie jak i interdyscyplinarną. Posiadła również umiejętność samodzielnego planowania, wykonania i oceny jakości wykonanej przez siebie syntezy chemicznej.

W rozprawie nie znalazłem poważnych błędów merytorycznych, a jedynie niewielkie nieścisłości. Na przykład na stronie 32. Autorka rozprawy pisze: „Fullerenes are preferred over nanolipids due to their lower toxicity and higher hydrophilicity, enabling stable complex formation and better nuclease protection. Their amphiphilic nature makes them effective delivery vectors for lung tissue as they are less prone to interact with erythrocytes, which, in the case of liposomes, can induce toxic effects.” Czy wszystkie fulereny wykazują właściwości amfifilowe czy tylko niektóre pochodne? Proszę Doktorantkę, aby w ramach części dyskusyjnej omówiła zjawisko amfifilowości oraz wpływ struktury na amfifilowość pochodnych fulerenów.

Podczas lektury opisu właściwości pochodnych fulerenów wpływających na ich wykorzystanie w terapii fotodynamicznej (str. str. 23-25) mgr Korzuch wspomina o przerwie energetycznej pomiędzy najwyższym obsadzonym a najniższym nieobsadzonym orbitalem molekularnym (HOMO-LUMO). Proszę o komentarz, w jakim zakresie proces projektowania pochodnych fulerenów mógłby być wspierany przez obliczenia komputerowe energii tych orbitali i przerwy energetycznej?

Zainteresowała mnie też znajdująca się pod koniec komentarza autorskiego (str. 59) bardzo dojrzała dyskusja o ograniczeniach zastosowania diskutowanych pochodnych ze względu na występujący proces agregacji. Poproszę o rozwinięcie tego wątku podczas części dyskusyjnej obrony doktorskiej. Czy mamy tutaj do czynienia wyłącznie z procesem agregacji, czy występuje również aglomeracja? Na czym polega różnica? W jaki sposób można byłoby w przyszłości kontrolować to zjawisko? A może można byłoby wykorzystać je w jakiś sposób w terapii celowanej?

Moja ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej mgr Julii Korzuch jest jednoznacznie pozytywna. Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a Doktorantka prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

4. Ocena strony edytorskiej

Zwyczajowym obowiązkiem recenzenta jest również ocena edytorskiej strony dysertacji. Rozprawa przygotowana jest bardzo przejrzysto i estetycznie. Język (angielski) użyty w pracy jest na poziomie wymaganym w publikacjach naukowych. Lekturę ułatwia spis użytych skrótów, choć brakuje wyjaśnienia skrótów technik analitycznych i pomiarowych. W przyszłości zalecałbym wprowadzenie numeracji nagłówków, co umożliwiłoby czytelnikowi łatwiejszą orientację w strukturze tekstu. Separatorem dziesiętnym w języku angielskim powinna być kropka, nie przecinek (por. str. 18). Tekst dodatkowo zyskałby wizualnie dzięki ujednoliceniu czcionki.

Przedstawione powyżej drobne uwagi nie wpływają na wysoką jakość merytoryczną pracy.

5. Konkluzja

W mojej ocenie rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie. Potwierdza również umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Drobne potknięcia, które wymieniłem w niniejszej recenzji nie wpływają na wysoką ocenę merytoryczną przeprowadzonych badań. Dlatego z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa mgr Julii Korzuch spełnia wymagania zwyczajowe i ustawowe (por. Art. 187 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* z dnia 20 lipca 2018 r. z późniejszymi zmianami) stawiane rozprawom doktorskim. Wniosuję zatem o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk, 15 lipca 2025 r.

KIEROWNIK
Katedra Chemii i Radiochemii
Środowiska

prof. dr hab. Tomasz Puzyn