

Dr hab. Piotr Młynarz, prof. PWr  
Zakład Chemii Bioorganicznej  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Wrocławska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

Wrocław, 25.07.2014 r.

## Recenzja

### **rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Pali zatytułowanej „Nanocząstki superparamagnetyczne – synteza, charakterystyka i funkcjonalizacja z użyciem makrocząsteczek biologicznych”**

Praca doktorska Pani mgr Katarzyny Pali została wykonana w Zakładzie Inżynierii Białka Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Otlewskiego. W Zakładzie tym od wielu lat prowadzi się z powodzeniem badania nad inżynierią i chemią białek oraz w pokrewnych obszarach badawczych, czego najlepszym dowodem jest niniejsza dysertacja.

Przedstawiona do recenzji praca to 92 strony maszynopisu podzielone na 6 rozdziałów. Praca nie jest obszerna, jednak zawiera wszystkie istotne dla dysertacji doktorskich elementy, i jest napisana w sposób przystępny, co znacznie ułatwia zrozumienie czytającemu. Tematyka pracy jest spójna pomimo tego, że Doktorantka poruszała problematykę z obszarów: nanotechnologii, chemii, biochemii i farmakologii. Wspólnym mianownikiem badań jest wykorzystanie nanocząstek superparamagnetycznych jako nowoczesnych nośników dla leków w terapii celowanej oraz hipertermii magnetycznej. Podjęta tematyka wpisuje się w trendy najnowszych badań z zakresu wykorzystania nanotechnologii w medycynie, a dowodem na istotność podjętych przez Panią mgr Katarzynę Palę badań jest opublikowanie wyników pracy w trzech czasopismach ze współczynnikiem oddziaływania IF większym od trzech.

Praca zaczyna się streszczeniem (w języku polskim i angielskim), które wprowadza czytelnika w problematykę podjętego tematu w sposób, który ułatwia analizę otrzymanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej wyników. Taki sposób prezentacji badań naukowych jest coraz częściej wykorzystywany podczas pisania dysertacji przez młodych naukowców.

W pierwszym rozdziale Pani mgr Katarzyna Pala umiejętnie wprowadza czytelnika w problematykę naukową pracy, opisując rodzaje nanocząstek, w tym nanocząstki superparamagnetyczne, złote, polimerowe i liposomowe, opisując ich właściwości i zastosowanie. Następnie przedstawia czynniki opłaszczające nanocząstki wraz z używanymi do tego celu polimerami oraz linkerami, które mogą hydrolizować w sposób programowany, w wyniku zmiany warunków środowiska. Wyjaśnia również potrzebę używania nanocząstek jako platform nośnych w onkologicznej terapii celowanej. Ten fragment wzbogaca tabela 1, w której przedstawione są koniugaty nanocząstek znajdujących się w różnych fazach badań klinicznych, co najlepiej świadczy o tym, że prowadzone przez Doktorantkę badania są aktualne i wartościowe. W dalszej części pracy Autorka wyjaśnia zastosowanie nanocząstek

w leczeniu termoterapią (hipertermią magnetyczną), tłumacząc samo zjawisko oraz podkreślając rolę nanocząstek wielofunkcyjnych w tym obszarze badań. Takie nanocząstki mogą posiadać na swojej powierzchni molekuly kierujące nanosfery, czyli receptory powierzchniowe – specyficzne do określonych typów komórek np. nowotworowych, obniżając w ten sposób cytotoksyczność skoniugowanego z nośnikiem terapeutycznego w stosunku do pozostałych komórek organizmu. Przykładem tego typu biomolekuł mogą być opisane aptamery. Na koniec rozdziału został opisany sposób dystrybucji i metabolizowania nanocząstek. Wszystkie poruszane aspekty w tym rozdziale świadczą o znajomości tematyki i swobodnym poruszaniu się Pani mgr Katarzyny Pali w realizowanym obszarze badań, czego dowodem jest umiejętne wykorzystanie literatury źródłowej, na którą składa się aż 149 pozycji literaturowych.

Rozdział 2 to „Cel pracy”, w którym Doktorantka sprecyzowała dokładnie kierunki badań będących przedmiotem niniejszej dysertacji.

W dalszej części rozprawy doktorskiej Autorka opisała procedury syntez nanosfer oraz zastosowaną metodologię badawczą. Zdaniem Recenzenta w tej części pracy brakuje precyzyjnych informacji dotyczących np. ilości używanych w reakcjach reagentów, co stwarza wrażenie, że protokoły eksperymentalne są przedstawione zbyt ogólnie. Dla przykładu w syntezie nanocząstek funkcjonalizowanych aptamerem (str 36) brakuje opisu, który jest przedstawiony w publikacji *“Tumor-specific hyperthermia with aptamer-tagged superparamagnetic nanoparticles”*, dodatkowo nie jest jasne dla czytającego dlaczego zredukowano grupy sulfhydrylowe w białku za pomocą 0.5 mM tris-2-karboksyetylofosfiny (TCEP), jeśli do nanocząsteczki był przyłączany aptamer. Dodatkowo w tabelach 2,3,4 powinno być wpisane natężenie prądu, a nie pole magnetyczne.

W ramach realizacji założeń pracy Pani Katarzyna Pala przeprowadziła syntezę nanocząstek magnetycznych opłaszczonych dekstranem, zawierających wolne grupy karboksylowe i karbonylowe. Otrzymane nanosfery były scharakteryzowane za pomocą pomiaru dynamicznego rozpraszania światła DLS, który wykazał monodispersyjność cząstek o hydrodynamicznym promieniu jonowym około 70 nm. Pomiar z zastosowaniem mikroskopii elektronowej wykazały, że średnica rdzenia tlenku żelaza wynosiła 10 nm, a badania krystalograficzne pozwoliły potwierdzić, że tlenek żelaza ma postać  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . W tym miejscu powstaje pytanie, czy ten sam wynik uzyskano względem nanocząstek NP@Dex=O i NP@Dex-COOH? Następny etap pracy obejmuje opis wyników syntezy nanocząstek  $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{@Au}$ , które ze względu na obecność rozpuszczalników organicznych nie mogły być wykorzystane w testach prowadzonych na komórkach. Zamiana rozpuszczalników na roztwór wodny, z jednoczesnym wykorzystaniem kwasu 11-merkaptoundekanowego, który może służyć jako bisfunkcyjny linker, spowodowała agregację zsyntezowanych nanocząstek, co uniemożliwiło dalsze badania. Pomimo tego, ta część badań zawiera element nowości - opracowanie nowej metody wyznaczenia zawartości żelaza i złota w próbce za pomocą spektroskopii LIBS. Otrzymane wyniki okazały się być zgodne z uzyskanymi przy dotychczas wykorzystywanej metodzie ICP, jednak nowa metoda posiada tę przewagę, że pozwala na pomiary zawartości pierwiastków w fazie stałej. Następnie Pani mgr Katarzyna Pala wykonała testy cytotoksyczności nanocząstek na liniach komórkowych, wykazując ich nietoksyczny charakter, a tym samym dużą użyteczność w dalszym projektowaniu nanosfer wielofunkcyjnych. W tym miejscu należało by zaznaczyć, że o ile w rozdziale drugim była opisana synteza nanocząstek NP@PEG to w rozdziale zawierającym wyniki eksperymentów

ta część została pominięta. Wyjaśnienia wymaga również fakt włączenia do testów aktywności NP@Dex-NH<sub>2</sub> (w opinii recenzenta był to bardzo trafny wybór, ważny dla testów porównawczych), których synteza jednak nie została wcześniej opisana. Do pełnego zobrazowania cytotoksyczności zsyntezowanych koniugatów zabrakło (na rysunku 10) również eksperymentów z nanosferami zawierającymi aptamer anty-Her2 (specyficzny względem linii komórkowej ludzkiego raka piersi SK-BR3, które nadprodukuje na swojej powierzchni receptor HER2), chociaż ich synteza i oddziaływanie z komórkami nowotworowymi zostały opisane w następnym podrozdziale oraz zaprezentowane na rysunku 12. W wyniku przeprowadzonych badań Pani mgr Pala wykazała wysoką selektywność oddziaływania nanocząstek zawierających aptamer w stosunku do linii komórkowych raka piersi. Do badań zostały włączone również nanosfery zawierające skoniugowaną herceptynę, struktury te nie były jednak opisane wcześniej, ale wnoszę że te nanocząsteczki posłużyły jako referencyjne w przeprowadzonych badaniach. Następnie Autorka pracy wyznaczyła liczbę cząsteczek aptameru przypadających na jedną nanocząstkę, jednak ten fragment wymaga doprecyzowania, ponieważ Doktorantka przyjmuje różne wielkości noncząstek - raz jest to 10 nm (str 43) cytując rysunek 6 a za drugim razem 5 nm (str 50), cytując również ten sam rysunek. W tym miejscu pojawia się moja prośba o wyjaśnienie takiego stanu rzeczy. W dalszej części Pani mgr Katarzyna Pala opisała w jaki sposób została potwierdzona obecność molekuly kierującej – affibody anty-Her2 w zsyntezowanej nanosferze. Niewątpliwie przeprowadzenie eksperymentów w których nanosfery mogą być wykorzystane w procesach termoterapii dodaje pracy dodatkowego wymiaru interdyscyplinarności przeprowadzonych badań. Eksperyment wymagał dobrania odpowiedniego natężenia prądu w celu otrzymania odpowiedniego pola magnetycznego indukowanego przez cewkę przy stałym stężeniu nanocząstek. Następnym etapem badań wykazał, że wzrost temperatury przy stałym natężeniu przyłożonego pola magnetycznego jest proporcjonalny do wzrostu stężenia nanocząstek. Doktorantka przeprowadziła także eksperymenty na liniach komórek nowotworowych wykazując, że żywotność komórek SK-BR3 oraz U 87-MG (linia komórkowa glejaka ludzkiego) jest dużo niższa (ok 60%) w odniesieniu do właściwych prób kontrolnych (rys. 17). W dalszym postępowaniu Pani mgr Pala badała nanocząstki zawierające aptamer, wykorzystując te same linie komórkowe. Z przeprowadzonego eksperymentu wynika że zmniejszyła się żywotność komórek jedynie w przypadku celowanej linii komórek raka piersi. Kolejną część pracy obejmuje opis koniugatów zawierających cytostatyki: monometylo-aurystatynę E (MMEA), doksorubicynę (Dox) i epirubicynę (EPI). Wykonane eksperymenty na liniach komórkowych z zastosowaniem nanocząstek NP@MMEA wykazały, że śmiertelność komórek jest większa w porównaniu do zastosowania niezwiązanego terapeutycznego. Podobne rezultaty zostały otrzymane dla NP@Dox i NP@EPI, gdzie koniugaty nanocząsteczek wykazały większą cytotoksyczność niż wolne cytostatyki. Przedostatnim przeprowadzonym eksperymentem były badania nad hipertermią prowadzone na liniach komórkowych przy użyciu nanocząstek zawierających MMEA. W tym celu wykonano test ApoToX po 7, 24, 48 i 72 godzinach po zaistnieniu hipertermii. Ciekawym zjawiskiem, które opisała Doktorantka, zaobserwowanym dla koniugatów nanocząstek, był oprócz zwiększonej aktywności tych struktur w drugiej dobie eksperymentu, brak aktywności proliferacyjnej komórek, co miało miejsce w przypadku pozostałych prób referencyjnych. Niestety wpływ pola magnetycznego na zjawisko żywotności, cytotoksyczności oraz apoptozy komórek SK-BR3 był niemal niezauważalny. Ostatnim omawianym eksperymentem była synteza nanocząsteczek wielofunkcyjnych zawierających nie tylko przyłączony cytostatyk, lecz również cząsteczkę kierującą - affibody. Kompleksy te wykazały selektywne działanie względem linii komórkowych raka piersi

nadprodukujących receptor Her2. Dalsze dwa rozdziały przedstawionej mi do oceny pracy to „Dyskusja” rozdział 5, w którym Doktorantka omawia swoje wyniki w odniesieniu do obecnego stanu wiedzy i „Podsumowanie” rozdział 6.

Reasumując, wszystkie cele rozprawy doktorskiej zostały w niniejszej pracy zrealizowane. Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej zaliczam: syntezę wielofunkcyjnych nanocząstek zawierających skoniugowany cytostatyk i cząsteczkę kierującą, zbadanie cytotoksyczności zsyntezowanych nanosfer oraz wpływu pola magnetycznego na komórki nowotworowe poddane działaniu nanocząstek. Dodatkowym osiągnięciem jest opracowanie i zoptymalizowanie nowej metody określania zawartości złota i żelaza w próbce za pomocą spektroskopii LIBS. Uzyskane w trakcie realizacji doktoratu wyniki stanowią wartościowe źródło informacji i podstawę do prowadzenia dalszych badań w tym zakresie.

Jak już wspomniałem praca jest napisana zwięźle i zrozumiale, a zarazem w sposób, który pozwala dostrzec duży nakład pracy laboratoryjnej i intelektualnej doktorantki, co z kolei przyczyniło się do uzyskania zaprezentowanych w dysertacji wyników.

Rolą recenzenta jest także wskazanie pewnych niedociągnięć, których trudno się ustrzec przy pisaniu rozprawy doktorskiej. I tak niedosyt budzi brak schematów syntez nanocząstek oraz rysunków, które w znaczny sposób wzbogaciłyby pracę. Doktorantka także nie uniknęła drobnych błędów językowych, które nie zostały wymienione w niniejszej recenzji i które nie wpływają na wartość naukową pracy.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Pali spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z 18 kwietnia 2003 z późniejszymi zmianami i uzupełnieniami) „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnioskuję do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

