



Prof. dr hab. Maria Nowakowska  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Jagielloński  
ul. Gronostajowa 2  
30-387 Kraków  
tel: 48 12 686 2534  
email:nowakowsk@chemia.uj.edu.pl

## **O C E N A**

**pracy doktorskiej Pani mgr Pamelii Krug**

**pt.: „Otrzymywanie, charakterystyka fizykochemiczna i ocena aktywności przeciwnowotworowej nanocząstek selenu i telluru modyfikowanych sulforafanem”.**

Badania prowadzące do przygotowania interdyscyplinarnej pracy doktorskiej Pani mgr Pamelii Krug przeprowadzone zostały w Zakładzie Chemii Fizycznej i Radiochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego i w Zakładzie Biotechnologii Leków i Bioinformatyki Narodowego Instytutu Leków w Warszawie. Doktorantka pracowała pod opieką promotorską Pana dr hab. Macieja Mazura, prof. UW oraz Pani dr hab. Katarzyny Wiktorowskiej, prof. Narodowego Instytutu Leków.

Celem badań zrealizowanych w ramach niniejszej rozprawy było otrzymanie nowych materiałów nanostrukturalnych charakteryzujących się wysoką aktywnością przeciwnowotworową i niską toksycznością układową. Cel pracy został dobrze zdefiniowany a tematyka prowadzonych badań jest niezwykle aktualna. Doktorantka włączyła się w nurt aktualnych badań zmierzających do opracowania skutecznych i mniej obciążających

pacjentów leków przeciwnowotworowych. Te wymagające szerokiej wiedzy i bogatego zaplecza infrastrukturalnego badania prowadzone są w wiodących laboratoriach światowych. Z uznaniem należy odnieść się do koncepcji zaplanowanych badań. Doktorantka zdecydowała o otrzymaniu materiałów nanostrukturalnych, wykorzystywanych w terapii/teranostyce i wzmocnieniu efektywności ich działania poprzez modyfikację powierzchniową obiektów nanostrukturalnych substancją biologicznie aktywną, wykazującą działanie przeciwnowotworowe. Analiza aktualnego stanu wiedzy pozwoliła Doktorantce na postawienie hipotezy, że wykazujące niską toksyczność a znaczny efekt terapeutyczny nanocząstki selenu, w szczególności takie, których powierzchnia zostanie zmodyfikowana sulforafanem (1-izotiocyjaniano-4-metylosulfinylobutanem) substancją pochodzenia naturalnego wykazującą działanie protekcyjne i terapeutyczne pozwoli na uzyskanie efektywnego układu dla potrzeb terapii przeciwnowotworowej. Badania te postanowiła Pani Krug poszerzyć o analogiczne eksperymenty z nanocząstkami telluru.

Pani mgr Pamela Krug przedstawiła swą rozprawę doktorską w formie obszernej, bo liczącej 199 stron monografii. Otwierająca pracę część literaturowa (53 strony) została przygotowana w oparciu o analizę 203 pozycji literaturowych (Autorka przywołała łącznie 318 pozycji literaturowych) i zawiera podstawowe informacje dotyczące nanomateriałów, w tym nanocząstek oraz omówienie podstaw terapii przeciwnowotworowych, roli w nich wybranych pierwiastków, związków chemicznych i otrzymanych z nich nanocząstek. Omawianie nanomateriałów rozpoczęła Pani mgr Krug od zdefiniowania ich typów, przybliżenia metod otrzymywania, wskazania unikalnych właściwości fizykochemicznych obiektów nanostrukturalnych i określenia głównych obszarów zastosowania. Następny podrozdział poświęciła analizie stanu wiedzy dotyczącej przydatności nanocząstek w terapii przeciwnowotworowej. Na podstawie bogatej literatury przedmiotu wskazała najpierw na te parametry strukturalne i fizykochemiczne nanocząstek, które predestynują je do zastosowań biologicznych. W tym kontekście przedyskutowała także poprawę właściwości nanocząstek poprzez ich modyfikację powierzchniową. Omawiając zastosowanie nanomateriałów w terapii i diagnostyce nowotworów wskazała na ich zdolności terapeutyczne, ale także na możliwość ich wykorzystania do transportowania substancji stosowanych w terapii przeciwnowotworowej: cytostatyków, fotouczulaczy czy raditerapeutyków. Sporo uwagi poświęciła możliwości wykorzystania nanocząstek w diagnostyce nowotworów. Zwróciła także uwagę na możliwość ich zastosowania w procedurach skorelowanej diagnostyki i terapii, czyli w teranostyce. W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiała wybrane

strategie wykorzystywane lub rozwijane w celu zwiększenia selektywności działania stosowanych w chemioterapii, ze szczególnym uwzględnieniem cytostatyków. Część literaturową zamyka rozdział poświęcony omówieniu właściwości biologicznych substancji, które były przedmiotem badań Doktorantki, czyli selenu i telluru, utworzonych zeń nanocząstek oraz sulforafanu, ze szczególnym uwzględnieniem ich działania protekcyjnego i terapeutycznego. Część literaturowa pracy została dobrze skonstruowana, jasno przedstawiona, a jej lektura pozwala stwierdzić, że Doktorantka posiada dobrą znajomość aktualnego stanu wiedzy w obszarze prowadzonych przez Nią badań.

Część badawcza obejmuje 118 stron i podzielona jest na dwa zasadnicze rozdziały obejmujące, odpowiednio: metodykę prowadzonych badań oraz prezentację rezultatów badań i dyskusję uzyskanych wyników. Metodyka badań została przedstawiona szczegółowo i starannie. Dotyczy ona zarówno badań chemicznych jak i biologicznych. Doktorantka wymieniła stosowane przez Nią materiały i aparaturę badawczą. Omówiła procedury otrzymywania nanocząstek i ich modyfikacji sulforafanem, zakres i metody prowadzenia badań fizykochemicznych, przybliżyła stosowane metodologie badań *in vivo*, *ex vivo* oraz *in vitro*. Nie mam zastrzeżeń do tego fragmentu pracy: procedury badawcze zostały opisane starannie, ze wskazaniem, tam gdzie to konieczne, literatury źródłowej. Przedstawione opisy umożliwiają zarówno powtórzenie procesów otrzymywania materiałów jak i przeprowadzenia badań fizykochemicznych oraz biologicznych.

Zasadniczą część rozprawy stanowi prezentacja i dyskusja uzyskanych wyników badań.

Nanocząstki selenu otrzymała Doktorantka w reakcji redukcji selenianu sodu kwasem askorbinowym. Celem uzyskania powierzchniowo modyfikowanych sulforafanem nanocząstek selenu proces syntezy prowadziła w obecności tej substancji w mieszaninie substratów. Fakt utworzenia nanocząstek potwierdziła i ich morfologię określiła w oparciu o wyniki obserwacji mikroskopowych, stosując technikę transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) oraz mikroskopii sił atomowych (AFM). Wykazała otrzymanie sferycznych nanocząstek. Ich rozmiary w próżni wyznaczyła przy użyciu techniki TEM, a w roztworze wodnym stosując technikę dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Średnice obiektów otrzymanych w obecności sulforafanu mierzone w próżni wynosiły około  $80.2 \pm 18.6$  nm zaś w roztworze wodnym  $86.8 \pm 16.2$  nm. Cząstki charakteryzowały się wysokim stopniem jednorodności (niskim stopniem dyspersyjności:  $DI < 0.1$ ). Nanocząstki otrzymane pod nieobecność sulforafanu

miały podobne rozmiary i nieco wyższy stopień dyspersji (w próżni  $78.9 \pm 15.4$ ,  $DI = 0.038$  i w roztworze wodnym  $97.1 \pm 20.9$  nm,  $DI < 0.1$ ). Co istotne, obiekty otrzymane w obecności sulforafanu nie wykazują tendencji do agregacji. Postawiono zatem hipotezę, że sulforafan jest zaadsorbowany na powierzchni nanocząstek i pełni funkcję stabilizatora.

Niezwykle starannie określiła Pani mgr Krug strukturę fazy nieorganicznej nanocząstek. Wykorzystała w tym celu spektroskopię Ramana, wysokorozdzielczą transmisyjną mikroskopię elektronową (HRTEM), selektywną dyfrakcję elektronów (SAED) oraz rentgenografię strukturalną (XRD). Wykazała, że w układzie tym współistnieje materiał w stanie amorficznym i krystalicznym, wyznaczyła wartość parametru sieci krystalicznej tak zorganizowanych domen i ustaliła strukturę fazy krystalicznej. Celem zweryfikowania hipotezy dotyczącej obecności sulforafanu na powierzchni nanocząstek przeprowadziła szereg badań fizykochemicznych. Warto zaznaczyć, że jednoznaczna weryfikacja tego założenia to zadanie niezwykle trudne. Doktorantka rozpoczęła ten proces od pomiaru i porównania wartości potencjału elektrokinetycznego nanocząstek otrzymanych w obecności sulforafanu i pod jego nieobecność. Stwierdziła, że te pierwsze charakteryzują się potencjałem równym  $-25.9 \pm 8.9$  mV, podczas gdy drugie mają potencjał wynoszący  $-17.6 \pm 7.8$  mV. Wynik ten dobrze koreluje z obserwowaną wyższą stabilnością koloidalną wodnych roztworów nanocząstek zawierających sulforafan. Różnicę wartości potencjałów powierzchniowych wyjaśniła zakładając adsorpcję sulforafanu na powierzchni nanocząstek selenu. Dalsze badania prowadzone przy użyciu spektroskopii z dyspersją energii promieniowania rentgenowskiego (EDS), spektroskopii w podczerwieni oraz spektroskopii fotoelektronów (XPS) uwiarygodniły to stwierdzenie. Co więcej, Doktorantka ustaliła, że sulforafan obecny na powierzchni nanocząstki selenu tworzy częściowo uporządkowaną monowarstwę, w której cząsteczki sulforafanu oddziałują z nanocząstkami selenu poprzez grupę sulfotlenkową. Akceptując te ustalenia nadal nie znajduję wyjaśnienia przyczyn wpływu adsorpcji sulforafanu na wartość potencjału powierzchniowego. Czy Doktorantka rozpatrywała rolę zanieczyszczeń substratami/produktami reakcji zachodzących podczas otrzymywania nanocząstek (ich obecność obserwowała eksperymentalnie) lub produktów możliwej reakcji kwasu askorbinowego z sulforafanem? Obecność bardzo intensywnego pasma z maksimum przy liczbie falowej  $3433\text{ cm}^{-1}$  wskazuje na obecność grup OH, które mogą wносить istotny wkład do wartości potencjału elektrokinetycznego. Szkoda, że Doktorantka nie przedstawiła analizy składu chemicznego powierzchni nanocząstek niemodyfikowanych sulforafanem, bo to mogłoby być pomocne w wyjaśnieniu tego zjawiska.

Stosując opracowaną technikę syntezy nanocząstek selenu Doktorantka podjęła działania zmierzające do otrzymania nanocząstek telluru. Reakcje prowadziła w obecności i pod nieobecność sulforafanu. Pomimo zastosowania bardziej restrykcyjnych warunków (wyższa temperatura, dłuższy czas reakcji) niż w przypadku syntezy nanocząstek selenowych, pod nieobecność sulforafanu nie uzyskała materiału nanostrukturalnego. Reakcja prowadzona w obecności sulforafanu doprowadziła natomiast do uzyskania złożonych pożądanymi nanostruktur tzw. nanokwiatów. Doktorantka postawiła hipotezę, że w procesie tworzenia tych nanostruktur rolę reduktora, a także mediatora, pełnią produkty rozpadu sulforafanu. Jest to hipoteza uzasadniona biorąc pod uwagę wartość potencjału redukcji telluru. Otrzymane materiały poddała Pani mgr Krug analizie fizykochemicznej przy użyciu analogicznego zestawu metod badawczych jak w przypadku nanocząstek selenu.

W kolejnym etapie pracy Doktorantka przedstawiła wyniki szeroko zakrojonych i dobrze zaplanowanych badań biologicznych. Rozpoczęła je od badań *in vivo* akumulacji i toksyczności otrzymanych nanocząstek oraz *ex vivo* wpływu sposobu wprowadzenia nanocząstek do organizmu zwierzęcia doświadczalnego (szczury rasy Wistar) na ich gromadzenie się w różnych organach oraz efektywność i drogi usuwania/wydalania z organizmu. Wykazała, że nanocząstki selenu modyfikowane sulforafanem są mniej toksyczne niż równoważna im dawka selenianu sodu. Zauważyła, że wprowadzenie dootrzewnowe może być preferowaną drogą podania w leczeniu nowotworów trzustki i wątroby, zaś podanie dożylnie odpowiednią w przypadku nowotworów płuc. Co istotne, ustaliła, że nanocząstki selenu nie pokonują bariery krew-mózg, co zapewnia bezpieczeństwo ich potencjalnego stosowania w terapiach nowotworów wyżej wskazanych organów. Stwierdziła również, że nanocząstki telluru podane dootrzewnowo lokują się w trzustce. Niestety perspektywy ich stosowania są ograniczone znaczną toksycznością.

W badania *in vitro* aktywności przeciwnowotworowej otrzymanych nanocząstek Doktorantka potwierdziła ich cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotworowych sutka i jelita grubego. Wyznaczyła parametry IC50 i co ważne, stwierdziła, że najwyższą wrażliwość na działanie nanocząstek selenu modyfikowanych sulforafanem wykazują komórki MDA-MB-231, niezwykle odporne na terapię raka sutka. Wykazała także wysoką selektywność działania tego materiału. Test, które przeprowadziła z użyciem nanocząstek telluru dały znacznie mniej zadowalające rezultaty.

Szczegółowe badania mechanistyczne dotyczące aktywności przeciwnowotworowej słusznie ograniczyła Pani mgr Krug do nanocząstek selenu. Stwierdziła, że sulforafan i nanocząstka selenu wykazują pożądane działanie synergiczne wobec komórek

nowotworowych sutka (MDA-MB-231) oraz jelita grubego (HT-29) i antagonistyczne wobec komórek prawidłowych sutka (MCF-10A) a także prawidłowych komórek jelita (CRL-1790). Tę selektywność działania wyjaśniła biorąc pod uwagę indukowanie przez nanocząstki selenu modyfikowane sulforafanem selektywnej aktywacji wewnętrznego szlaku apoptozy. Zwróciła uwagę, że nanocząstki selenu indukują generację reaktywnych form tlenu i że proces ten jest znacznie bardziej efektywny w komórkach nowotworowych niż w prawidłowych. Powstaje pytanie o to czy znany jest mechanizm tego procesu i jakie jego elementy odpowiadają za tę różnicę? Czy jest to istotnie różnica w procesie tworzenia tych indywiduów czy raczej w ich stężeniu w stanie stacjonarnym, którego poziom determinowany jest także efektywnością (wyższą w komórkach prawidłowych) ich dezaktywacji. Doktorantka obserwowała także silny proces depolaryzacji błony mitochondrialnej w komórkach nowotworowych, co w połączeniu z reakcjami oksydacyjnymi inicjowanymi reaktywnymi formami tlenu (obecnymi w wysokich stężeniach) prowadzi do apoptozy tych komórek. Niższa wrażliwość komórek prawidłowych na działanie nanocząstek wynika z uruchamiania w nich procesów naprawczych. Wniosek ten sformułowała Doktorantka na podstawie bardzo przekonujących wyników przeprowadzonych eksperymentów.

Badając rolę poszczególnych składników nanocząstek modyfikowanych sulforafanem Pani mgr Krug ustaliła, że sulforafan w stężeniu, w jakim jest obecny w strukturze nanocząstek nie odgrywa istotnej roli w działaniu przeciwnowotworowym, a jedynie zwiększa biodostępność nanocząstek. To bardzo interesująca obserwacja jednak podzielałam pogląd Doktorantki, że ten element badań wymaga pogłębienia.

### **Wnioski końcowe.**

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr Pameli Krug stwierdzam, że główny cel pracy został dobrze zdefiniowany, a dobór materiału i metod badawczych pozwolił na jego realizację. Badania, których rezultaty Doktorantka przedstawiła w niniejszej pracy, dotyczą ważnego obszaru badawczego z pogranicza nauk chemicznych, nanotechnologii i nauk biomedycznych. Doktorantka legitymuje się pogłębioną wiedzą i umiejętnościami eksperymentalnymi w tym szerokim interdyscyplinarnym obszarze wiedzy. Opanowała zarówno podstawy fizykochemiczne jak i zdobyła kompetencje instrumentalne

umożliwiający właściwy dobór technik badawczych, przeprowadzenie pomiarów i interpretację wyników. Oprócz syntezy materiałów nanostrukturalnych ich charakteryzacji fizykochemicznej z powodzeniem prowadziła badania biologiczne *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro*. Prace doświadczalne przeprowadziła starannie i zasadniczo dobrze zinterpretowała uzyskane rezultaty. Otrzymała i wskazała nowe materiały nanostrukturalne potencjalnie przydatne w terapii przeciwnowotworowej.

Na podstawie bazy Scopus ustaliłam, że Pani mgr Pamela Krug jest współautorką 7 publikacji w prestiżowych specjalistycznych czasopismach naukowych takich jak: *Spectrochimica Acta- Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (2 prace), *Synthetic Metals*, *Nanotechnology*, *International Journal of Pharmaceutics* i *Materials Science and Engineering C.*, *European Polymer Journal*. Jedną z tych prac jest ściśle związana z pracą doktorską (*Nanotechnology*).

Biorąc pod uwagę powyższe uważam, że spełnione są warunki ustawy o stopniach i tytułach naukowych i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pani mgr Pameli Krug do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną pracy, interdyscyplinarne podejście do rozwiązania postawionego problemu badawczego oraz fakt opublikowania części zawartych w niej wyników w specjalistycznym czasopiśmie naukowym wnoszę o jej wyróżnienie.**

Kraków 28.06.2019 r.



## WNIOSEK

**o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Pameli Krug  
pt.: „Otrzymywanie, charakterystyka fizykochemiczna i ocena aktywności  
przeciwnowotworowej nanocząstek selenu i telluru modyfikowanych sulforafanem”.**

Niniejszym składam wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Pameli Krug.

### *Uzasadnienie.*

Praca doktorska Pani mgr Pameli Krug dotyczy ważnej i trudnej interdyscyplinarnej tematyki badawczej lokującej się na pograniczu chemii, nanotechnologii i nauk biomedycznych..

Pani mgr Krug racjonalnie zaplanowała i zrealizowała nakreślony plan badawczy.

W szczególności:

- 1) Otrzymała nowe nanostrukturalne materiały – nanocząstki selenu modyfikowane powierzchniowo sulforafanem, substancją pochodzenia naturalnego wykazującą aktywność przeciwnowotworową.
- 2) Określiła właściwości fizykochemiczne i biologiczne otrzymanych układów.
- 3) Wykazała pożądane synergiczne działanie składników układu (nanocząstki i sulforofan) w stosunku do komórek nowotworowych i antagonistyczne w stosunku do komórek prawidłowych.
- 4) Wyjaśniła mechanizm przeciwnowotworowego działania otrzymanych nanocząstek
- 5) Wskazała organy, w których preferencyjnie lokują się nanocząstki i zależność tego procesu od sposobu wprowadzenia preparatu do organizmu.
- 6) Część wyników badań będących przedmiotem rozprawy została już opublikowana w prestiżowym czasopiśmie naukowym.
- 7) Pani mgr Pamela Krug posiada wartościowy dorobek naukowy - jest współautorką 7 wartościowych publikacji naukowych.

Kraków 28.06. 2019 r.

