



Prof. dr hab. Maria Nowakowska
Wydział Chemii
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 2
tel: (48 12) 686 2534
email:nowakows@chemia.uj.edu.pl

O C E N A

**pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Rękorajskiej
zatytułowanej: „Projektowanie, synteza i charakterystyka magnetycznych
nanocząstek tlenków żelaza i tlenków żelaza domieszkowanych kationami
lantanowców oraz ich wykorzystanie w konstrukcji liposomalnych
nośników leków”**

Praca doktorska Pani mgr Aleksandry Rękorajskiej została przygotowana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego pod opieką promotorską Pana Prof. dr hab. Pawła Krysińskiego.

Celem badań zrealizowanych w ramach niniejszej rozprawy było otrzymanie i określenie właściwości fizykochemicznych nowych

nanostrukturalnych materiałów superparamagnetycznych potencjalnie przydatnych w terapii przeciwnowotworowej, w szczególności umożliwiających realizację celowanego dostarczenia leku do tkanki zmienionej chorobowo i kontrolowanego jego uwalniania, a także zlokalizowanej radioterapii.

Cel pracy został dobrze zdefiniowany, a tematyka prowadzonych badań jest niezwykle aktualna. Stale rosnąca liczba osób cierpiących na choroby nowotworowe sprawia, że schorzenia te stają się istotnym problemem medycznym i społecznym. Poszukiwanie nowych, bardziej efektywnych i mniej inwazyjnych metod terapeutycznych stanowi wyzwanie, na które próbuje odpowiedzieć nauka. Niniejsza praca wnosi istotne elementy nowości do tej domeny wiedzy.

Pani mgr Rękorajska przygotowała i przedstawiła rozprawę doktorską w tradycyjnej formie opracowania, w którym wyróżniła część literaturową i eksperymentalną, a także omówiła wykorzystywane w pracy techniki eksperymentalne. Pracę uzupełniła krótkim wstępem i przydatnym wykazem stosowanych skrótów, zestawieniem wniosków wynikających z przeprowadzonych badań i bibliografią. Obejmująca 61 stron część literaturowa podzielona została na siedem rozdziałów, w których Doktorantka omówiła kolejno: terapie przeciwnowotworowe, podstawy farmakoterapii, właściwości doksorubicyny, stosowanego w praktyce medycznej leku przeciwnowotworowego, i jego formulacji liposomalnej, przybliżyła zagadnienia dotyczące struktur lipidowych i pęcherzyków liposomalnych. Sporo uwagi poświęciła nanocząstkom magnetycznym, ze szczególnym uwzględnieniem nanocząstek tlenków żelaza oraz możliwościom domieszkowania ich rdzenia kationami innych metali. Przedstawiła także podstawowe modele stosowane do opisu kinetyki uwalniania leku z matrycy jego nośnika. Wybór zagadnień omawianych w tej części pracy jest prawidłowy i logiczny. Tematyka tego opracowania dobrze koresponduje z

problematyką badań własnych Doktorantki. Zostało ono przygotowane na podstawie 120 dobrze wyselekcjonowanych pozycji literaturowych. Większość uwzględnionych w nim publikacji ukazała się w ostatniej dekadzie. Po zapoznaniu się z tym fragmentem pracy stwierdzam, że Pani mgr Rękorajska posiada dobrą znajomość aktualnego stanu wiedzy w przedmiocie prowadzonych przez Nią badań.

Jak wspominałam powyżej, w kolejnym fragmencie pracy Doktorantka omówiła stosowane techniki, w tym te służące wytwarzaniu układów biomimetycznych, techniki elektrochemiczne i metody badań fizykochemicznych. Mam wątpliwość dotyczącą celowości szczegółowego przedstawiania rutynowo stosowanych metod fizykochemicznych, szczególnie tych, których Doktorantka nie wykorzystywała osobiście, lecz zlecała wykonanie badań przy ich użyciu.

Część eksperymentalną otwiera opis syntezy nanocząstek tlenków żelaza, funkcjonalizacji ich powierzchni i domieszkowania ich rdzeni jonami lantanowców. Doktorantka otrzymywała nanocząstki tlenków żelaza znaną metodą współstrącania, którą poddała optymalizacji i modyfikacji. W szczególności opracowała dwie, różniące się czasem trwania reakcji, procedury pozwalające na otrzymanie nanocząstek o satysfakcjonujących właściwościach fizykochemicznych. Opracowanie metody krócej trwającej syntezy było istotne w kontekście planowanego domieszkowania rdzeni nanocząstek jonami lantanowców, docelowo, jonami radionuklidów o krótkim okresie półtrwania. Funkcjonalizacja powierzchni nanocząstek tlenków żelaza przy użyciu kwasu oleinowego pozwoliła na uzyskanie obiektów hydrofobowych, zaś kwasem cytrynowym, obiektów hydrofilowych. Doktorantka scharakteryzowała otrzymane materiały stosując szereg metod fizykochemicznych. Nie mam zastrzeżeń do tej części pracy, chociaż zabrakło badań, które pozwoliłyby określić czy Doktorantka otrzymała nanocząstki magnetytu czy maghemitu.

Wyniki badań krystalograficznych nie pozwalają na dokonanie tego rozróżnienia. Doktorantka wskazuje na ten fakt, lecz w dalszej części pracy zakłada, że otrzymała magnetyt. Warto uzupełnić te badania stosując spektroskopię mössbauerowską. Co jednak istotne w kontekście realizacji celu pracy, przeprowadzone badania pozwoliły Doktorantce wykazać potencjalną przydatność otrzymanych nanocząstek do rozważnych przez Nią zastosowań terapeutycznych. Szczególnie ważne były pożądanymi rozmiary otrzymanych cząstek, dyspersja, stopień krystaliczności, zdolność do tworzenia stabilnych zawiesin, a także ich właściwości magnetyczne.

Ciekawych wyników dostarczyły modelowe badania domieszkowania rdzeni nanocząstek tlenków żelaza jonami terbu lub gadolinu. Badania te prowadzono w oparciu o hipotezę, że wprowadzenie do struktury nanocząstek magnetycznych radionuklidu (lub jego prekursora), np. jonu ^{160}Gd będącego prekursorem izotopu terbu ^{161}Tb , emitującego promieniowanie β^- , pozwoli na dostarczenie go do guza nowotworowego przy użyciu zewnętrznego pola magnetycznego i realizację celowanej, zlokalizowanej radioterapii. Zasadniczą trudność w syntezie tych materiałów wynika z dużej różnicy rozmiarów jonów żelaza i badanych lantanowców: gadolinu i terbu. Należy zatem uznać za sukces fakt, że Doktorantka uzyskała krystaliczne, superparamagnetyczne nanocząstki tlenków żelaza zawierające ok. 2.5% jonów gadolinu lub terbu. Mam jednak wątpliwość dotyczącą prawidłowości określenia tego stężenia ponieważ Doktorantka założyła, że zawartość lantanowców w rdzeniu nanocząstek odpowiada stosunkowi substratów użytych do syntezy. Precyzyjna informacja dotycząca zawartości kationów lantanowca wbudowanych w strukturę nanocząstek jest istotna także w wymiarze praktycznym. Należałoby bowiem określić jakie stężenie ^{161}Tb będzie niezbędne i wystarczające do celów terapeutycznych biorąc pod uwagę czas syntezy, transportu, podania, a nade wszystko krótki czas półtrwania izotopu ^{161}Tb . Uważam jednak, że samo

uzyskanie tych struktur obdarzonych interesującymi właściwościami są sporym osiągnięciem.

Dla realizacji celowanego dostarczenia leku i jego kontrolowanego uwalniania Doktorantka postanowiła udoskonalić obecnie stosowaną formułę liposomalną doksorubicyny Doxil®, zastępując klasyczne liposomy układami magnetoliposomów, czyli liposomów zawierających nanocząstki magnetyczne. Otrzymała magnetoliposomy zawierające nanocząstki hydrofobowe wbudowane w biwarstwy lipidowe oraz nanocząstki hydrofilowe zamknięte we wnętrzu pęcherzyków. Dokonała optymalizacji procedury otrzymywania magnetoliposomów i zawartości nanocząstek (ok. 5% wag.). W tym celu posłużyła się wynikami badań wpływu nanocząstek na właściwości mechaniczne biwarstwy oraz na organizację przestrzenną tych obiektów w biwarstwie. Potwierdziła także ich właściwości magnetyczne. Podzielałam pogląd Doktorantki, że dla lepszej charakteryzacji otrzymanych struktur bardzo przydatną byłaby mikroskopia cryo-TEM i zgadzam się, że jest to technika o wciąż ograniczonej dostępności.

Sporo uwagi poświęciła Pani mgr Rękorajska opracowaniu metody wprowadzania leku do wnętrza liposomów. Wykazała, że najbardziej efektywne jest aktywne ładowanie liposomów w gradiencie pH, możliwe do zastosowania w przypadku użycia jako nośników magnetoliposomów zawierających nanocząstki hydrofobowe. We wnętrzu tych pęcherzyków można zamknąć ok. (63 ± 3) % obecnego w układzie leku (chlorowodoru doksorubicyny).

Stosując metody elektrochemiczne (SWV) oraz spektrofluorometryczne badała Doktorantka kinetykę uwalniania leku z wnętrza magnetoliposomów. Wykazała, że stosując zmienne pole magnetyczne o niskiej częstotliwości można kontrolować uwalnianie leku z obu typów magnetoliposomów, przy czym efektywność tego procesu jest znacznie wyższa w przypadku magnetoliposomów zawierających nanocząstki hydrofobowe. Efekt ten

wyjaśniła biorąc pod uwagę stopniową destrukcję biwarstwy lipidowej, a w konsekwencji liposomów przez nanocząstki drgające w zmiennym polu magnetycznym. Obrazowanie układów techniką TEM potwierdziło rozpad magnetoliposomów poddanych działaniu zmiennego pola magnetycznego. Z obserwacją tą dobrze koreluje fakt, że kinetykę uwalniania leku najlepiej opisuje model Korsmeyera-Peppasa, sugerujący dyfuzyjny charakter tego procesu.

Przeprowadzone badania wskazują, że magnetoliposomy zawierające hydrofobowe, magnetyczne nanocząstki tlenków żelaza stanowią interesujące obiekty badawcze jako efektywne nośniki chemioterapeutyków umożliwiające realizację celowanej i kontrolowanej terapii przeciwnowotworowej. Fakt ten potwierdziły wstępne badania biologiczne przeprowadzone we współpracy z Politechniką Warszawską na prawidłowych liniach komórkowych (linie nabłonkowe piersi MCF-7) i nowotworowych (komórki gruczolaka piersi) MCF-10A. Pozwoliły one ustalić, że otrzymane nośniki liposomalne nie wykazują toksyczności oraz, że stężenie uwolnionej w wpływie biernym dokсорubicyny jest także nietoksyczne zaś lek uwolniony z nośnika pod wpływem zmiennego pola magnetycznego wykazuje selektywne działanie: jest toksyczny jedynie dla komórek nowotworowych.

Wnioski końcowe.

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr Aleksandry Rękorajskiej stwierdzam, że główny cel pracy został dobrze zdefiniowany, a dobór materiału i metod badawczych pozwolił na jego realizację. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy należą do głównego, światowego nurtu badań nad nowymi układami dla potrzeb zaawansowanej terapii przeciwnowotworowej. Doktorantka wykazała się dobrym przygotowaniem

merytorycznym i dużą sprawnością eksperymentalną. Należy zauważyć, że pomyślna realizacja badań była możliwa dzięki zastosowaniu szeregu nowoczesnych, komplementarnych metod badawczych. Pani mgr Rękorajska opanowała zarówno podstawy fizykochemiczne jak i zdobyła kompetencje instrumentalne umożliwiające właściwy dobór technik badawczych, przeprowadzenie pomiarów i interpretację wyników.

Na podstawie bazy danych Scopus ustaliłam, że Pani mgr Rękorajska jest współautorką 4 publikacji w prestiżowych specjalistycznych czasopismach naukowych, takich jak: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, *Nanotechnology*, *Electrochemistry Communications*. W trzech tych publikacjach jest pierwszym autorem, a prace są już cytowane przez innych autorów.

Biorąc pod uwagę powyższe uważam, że spełnione są warunki ustawy o stopniach i tytułach naukowych z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65) znowelizowanej w dniu 18 marca 2011 r. (Dz.U. 2011 nr 84 poz. 455) i wnoszę do Rady Dyscypliny Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Rękorajskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną pracy, fakt opublikowania znacznej części zawartych w niej wyników w uznanych specjalistycznych czasopismach naukowych wnoszę o jej wyróżnienie.



Kraków 7 wrzesień 2020 r.

Prof. dr hab. Maria Nowakowska
Wydział Chemii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 2
tel: (48 12) 686 2534
email:nowakows@chemia.uj.edu.pl

WNIOSEK

Niniejszym wnioskuję wyróżnienie rozprawy doktorskiej
**Pani mgr r Aleksandry Rękorajskiej zatytułowanej: "Projektowanie,
synteza i charakterystyka magnetycznych nanocząstek tlenków żelaza i
tlenków żelaza domieszkowanych kationami lantanowców oraz ich
wykorzystanie w konstrukcji liposomalnych nośników leków"**

UZASADNIENIE

Praca doktorska Pani Mgr Rękorajskiej dotyczy ważnej i aktualnej tematyki badawczej koncentrującej się na projektowaniu, otrzymaniu nowych nanostrukturalnych materiałów superparamagnetycznych potencjalnie przydatnych w terapii przeciwnowotworowej, w szczególności umożliwiających realizację celowanego dostarczenia leku do tkanki zmienionej chorobowo i kontrolowanego jego uwalniania, a także zlokalizowanych terapii skrzyżowanych (chemio-radioterapii).

Doktorantka otrzymała szereg materiałów nanostrukturalnych o interesujących właściwościach. Na szczególną uwagę zasługuje:

- 1) Opracowanie metody otrzymywania superparamagnetycznych nanocząstek tlenków żelaza, których rdzenie domieszkowano jonami gadolinu i terbu otwierająca możliwość syntezy układów do celowanej i zlokalizowanej radioterapii.
- 2) Otrzymanie magnetopiliposomów i wykazanie ich przydatności jako efektywnych nośników chemoterapeutyków, których dostarczanie do zmienionej chorobowo tkanki i uwalnianie leku może być kontrolowane przy użyciu zewnętrznego, zmiennego pola magnetycznego o niskiej częstotliwości.
- 3) Wstępna weryfikacja pożądanej aktywności biologicznej otrzymanych układów w warunkach in vitro (współpraca z Politechniką Warszawską).

O dobrej pozycji Pani mgr Rękorajskiej w nauce i wysokiej jakości uzyskanych przez Nią wyników zaświadcza fakt, że wyniki Jej badań zostały opublikowane w specjalistycznych, prestiżowych czasopismach międzynarodowych.

M. Nowokor, le