

Lublin, dn. 14.09.2020

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Rękorajskiej:**„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 wykonana w Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem Prof. dr hab. Pawła Krysińskiego. Zespół badawczy Pana profesora od wielu lat, między innymi, prowadzi badania monowarstw i dwuwarstw lipidów i fosfolipidów oraz badania wykorzystania magnetycznych nanocząstek w aspekcie celowanego dostarczania leków przy pomocy zewnętrznego pola magnetycznego, szczególnie w chorobach nowotworowych.

Wybór tematyki

Badania w pracy doktorskiej ukierunkowane były na możliwość wykorzystania liposomów z umieszczonym wewnątrz nich lekiem i wbudowanymi nanocząstkami tlenków żelaza o właściwościach magnetycznych. Obecność takich nanocząstek powinna umożliwić skierowanie leku w odpowiednie miejsce w terapii nowotworowej. Jak powszechnie wiadomo, choroby nowotworowe są drugą przyczyną zgonów po chorobach układu krążenia. Pomimo rozwijanej profilaktyki i dość skutecznych metod diagnostycznych, liczba zachorowań na nowotwory rośnie i według raportu GLOBOCAN (Global Cancer Observatory) z 2018 liczba ta w ciągu 5 lat niestety wzrosła z 14,1 mln do 19,3 mln. W Polsce według Krajowego Rejestru Nowotworów rocznie rejestruje się około 165 tysięcy zachorowań i umiera około 100 tysięcy osób w wyniku nowotworów złośliwych. Ważną sprawą jest więc ulepszanie obecnie stosowanych terapii w leczeniu nowotworów. Między innymi, istotne jest ograniczenie skutków ubocznych w stosowanych terapiach farmakologicznych, takich jak równoczesne niszczenie komórek zdrowych. Opracowanie więc terapii pozwalającej na selektywne niszczenie komórek chorych poprzez dostarczenie do nich leku jest podstawowym problemem, który obecnie jest szeroko badany. W tym celu w badaniach wykorzystuje się między innymi magnetyczne cząstki tlenków żelaza.

W 2017 roku Wu i Huang opublikowali w *Molecular and Clinical Oncology* (7, 738-46) przeglądową pracę wartą zacytowania: *“Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis, drug delivery and treatment”*. W podsumowaniu stwierdzili, że magnetyczne nanocząstki (MNPs) mogą zapewnić wysoce efektywne układy celowanego dostarczania leku. Równocześnie, jednakże stwierdzili, że pomimo wielu pomyślnych wyników badań, wciąż pozostają pewne wyzwania w teranostycznym (ściśle połączenie diagnostyki i terapii) zastosowaniu tych materiałów. *“By focusing on improving their drug loading capacity, and increasing their specificity and affinity to target cancer cells, MNPs may become suitable for clinical use with integrated imaging and multimodal therapy in the near future and dramatically impact the treatment of cancer”*.

Chociaż Autorka w temacie rozprawy nie wymieniła, że przeprowadzone badania były ukierunkowane na nośniki leków w terapii przeciwnowotworowej, to już we *‘Wstęp i Cel*

Pracy' stwierdziła, niezbyt poprawnie stylistycznie, że „celem niniejszej prac była synteza i potencjalnym wykorzystaniu w nowoczesnych terapiach przeciwnowotworowych nanocząstek tlenku żelaza(II) i (III)”. W świetle powyższych danych odnośnie do chorób nowotworowych w Polsce i na świecie i zacytowanej pracy z 2017 roku, tematyka rozprawy doktorskiej Mgr Aleksandry Rękorajskiej jest bezdyskusyjnie bardzo aktualna i nowatorska. Właściwości magnetyczne takich cząstek osadzonych na liposomach lub w liposomach, z lekiem przeciwnowotworowym, umożliwiają celowane ich skierowanie do komórek nowotworowych i dopiero wówczas uwolnienie leku przy pomocy zewnętrznego pola magnetycznego. Same cząstki magnetyczne nie wykazują dużej toksyczności dla organizmu a ich otrzymywanie jest proste, co powoduje atrakcyjność ich wykorzystania w medycynie.

Formalna ocena pracy doktorskiej i merytoryczna części literaturowej

Praca doktorska zawiera 157 stron i napisana jest w typowej formie, tj. składa się z części literaturowej (71 stron) i części doświadczałnej (70 stron) oraz wniosków zawartych na 2 stronach. Ponadto załączona do pracy bibliografia liczy 145 pozycji, z których tylko 27 opublikowane było przed rokiem 2010 i tylko 14 z nich jest starszych niż 20 lat. W części literaturowej zacytowano 126 pozycji. Duża liczba cytowani prac z ostatnich 10-ciu lat także świadczy o aktualności badanych zagadnień. W części literaturowej Autorka dokonała krótszego bądź dłuższego przeglądu bardzo różnorodnych zagadnień związanych z częścią doświadczałną Jej pracy ilustrując je 19 rysunkami. Niektóre zagadnienia można byłoby pominąć, jak na przykład „Struktury lipidowe” (str. 19-21) lub częściowo rozdział 1.6 dotyczący tlenków żelaza (str.33-42). Z drugiej strony, ta część literaturowa może być bardzo użyteczną lekturą dla początkujących członków zespołu badawczego i studentów. W tej części Mgr Rękorajska dokonała również zwięzłego i udanego przeglądu terapii nowotworowych, po czym opisała lapidarnie trzy etapy rozwoju farmakologii, poczynając od lat pięćdziesiątych i następnie skupiła się na antybiotyku doksorubicynie (DOX) powszechnie stosowanym w terapii antynowotworowej, który stosowała w swoich badaniach. W dalszej części literaturowej Autorka opisała struktury lipidów i metody otrzymywania liposomów i zamykania w nich substancji, tzw. metodą bierną i aktywną, kończąc opisem leku Doxil®, który jest liposomem fosfatydylocholin i cholesterolu z zewnętrzną warstewką glikolu metoksy polietylenowego i zamkniętą wewnątrz doksorubicyną. Taka struktura bardzo wydłuża czas obecności leku we krwi. Następny rozdział części literaturowej dotyczy nanocząstek magnetycznych i zawiera opis metod ich otrzymywania i modyfikacji powierzchni różnymi substancjami. Wspomniała także o hipertermii, czyli termoterapii przy pomocy różnych technik. Poświęciła też Rozdział 1.6.7 domieszkowaniu nanocząstek tlenków żelaza kationami metali dwuwartościowych (Cu, Mn, Zn, Ni) które zastępują Fe^{2+} , lub kationy Fe^{3+} podstawiane lantanowcami. Omówiła również kinetykę uwalniania leków z nośników, opisując trzy modele. Część literaturową kończy dość obszerny (17 stron) opis stosowanych przez Autorkę metod badawczych i technik pomiarowych, których było dużo: filmy Langmuira-Blodgett, czarne błony, metody elektroanalityczne, mikroskopia elektronowa, AFM, XRD, dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), potencjał zeta, magnetometria, termogravimetria. Część literaturową pracy oceniam bardzo pozytywnie, pomimo, że kilka rozdziałów można byłoby pominąć, niemniej jednak mogą one być użyteczne.

W części doświadczałnej pracy Mgr Rękorajska po zestawieniu stosowanych odczynników i materiałów oraz opisie metodyki pomiarów, w sposób systematyczny omawia kolejne etapy badań, przeprowadzone eksperymenty i uzyskane wyniki, kończąc pracę wnioskami i spisem cytowanych prac. W tej części zamieściła 38 rysunków i 9 tabel ilustrujących wyniki badań.

Ocena merytoryczna części doświadczałnej pracy

Część literaturowa pracy świadczy, że Pani mgr Rękorajska była dobrze przygotowana teoretycznie i eksperymentalnie do przeprowadzenia kompleksowych badań rozpoczynając od

otrzymania nanocząstek o właściwościach magnetycznych tlenków żelaza i określeniu ich właściwości. Następnie tlenki te domieszkowała kationami gadolinu lub terbu, co wynikało z zastosowań izotopów promieniotwórczych tych pierwiastków w radioterapii. Po czym wykonała badania wpływu ilości nanocząstek na właściwości elastyczne dwuwarstw fosolipidowych. Pozwoliło to Autorce na wbudowanie w strukturę liposomów odpowiedniej ilości tych superparamagnetycznych nanocząstek tlenków żelaza (z ang. SPION) o wcześniej zmodyfikowanej ich powierzchni (hydrofobowa lub hydrofilowa). W ten sposób otrzymała tzw. magnetoliposomy, w których cząstki magnetyczne, w zależności od ich właściwości hydrofobowych lub hydrofilowych, znajdowały się odpowiednio na powierzchni liposomów lub w ich wnętrzu. W następnym etapie Mgr Rękorajska przeprowadziła badania wprowadzenia antybiotyku (doksorubicyny) do pęcherzyków liposomów i uwalniania go z pęcherzyków przy pomocy zewnętrznego zmiennego pola magnetycznego, pokazując różnice w ilości uwolnionego leku w zależności od umiejscowienia nanocząstek magnetycznych w liposomie. Wreszcie w końcowym etapie, we współpracy z inną doktorantką, przeprowadziła badania *in vitro* skuteczności wytworzonych nośników antybiotyku w oddziaływaniu na komórki tkanek piersi. Autorka całościowo przeprowadziła bardzo dobrze zaplanowane badania uzyskując w kolejnych etapach ich przeprowadzania interesujące wyniki, które w większości zostały już opublikowane (prace 4-8 w spisie literatury, Impact Factor 2,72 – 8,76). Należy podkreślić, że praca doktorska jest interdyscyplinarna z dziedziny chemii koloidów (otrzymywanie nanocząstek magnetycznych, filmy Langmuira, micelle, liposomy), krystalografii (struktura otrzymanych tlenków), chemii analitycznej i analizy instrumentalnej (badania spektroskopowe, mikroskopii elektronowej, AFM, voltamperometryczne, X-ray, termogravimetria), farmakologii i medycyny (badania *in vitro* uwalniania leku i oddziaływania na żywe komórki).

Oczywiście nie jest możliwe w recenzji dokładne zrelacjonowanie tak dużej ilości przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Jak wspomniałem powyżej, pierwszym i zasadniczym etapem badań było otrzymanie nanocząstek tlenków żelaza i zbadanie ich wielkości oraz struktury (magnetyt i maghemit). Autorka w rozdziale 3.3 szczegółowo opisuje dwa sposoby otrzymywania tych nanocząstek, tzw. „*metodą dłuższą*”, i „*metodą krótszą*”. Rozdział ten zatytułowała „*Synteza nanocząstek tlenków żelaza*” (str.86), również w tytule pracy jest użyte słowo „*synteza*”. Jednakże w chemii reakcję syntezy określa się jako rodzaj reakcji, w której z prostszych substratów (pierwiastków lub związków chemicznych) powstaje związek bardziej skomplikowany (produkt syntezy). Natomiast w tej pracy zastosowano reakcję wytrącania. W „*metodzie dłuższej*” nanocząstki otrzymano poprzez współstrącanie z roztworu jonów Fe^{2+} i Fe^{3+} roztworem amoniaku. Cząstki te po wytrąceniu pokrywano cząsteczkami kwasu oleinowego w celu hydrofobizacji ich powierzchni. Przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego stwierdziła, że otrzymane cząstki są sferyczne w kształcie a średnia ich wielkość wynosiła 7 nm. Badania dyfrakcji promieni X (PXRD) wykazały, że jest to magnetyt i maghemit ale obliczona ich wielkość była znacznie większa, ok. 22 nm. Autorka tłumaczy to niejednorodnym rozkładem cząstek i obecnością innych cząstek niż sferyczne w badanej próbce. Następnie metodą termogravimetrii wyznaczyła, że ilość kwasu oleinowego na powierzchni nanocząstki wynosiła około 30% masy próbki. Przyjmując sferyczny kształt komórki elementarnej nanocząstek (średnica 7,3 nm) oszacowała masę jednej cząstki i znając powierzchnię zajmowaną przez cząsteczkę kwasu oleinowego obliczyła, że powierzchnia zajmowana przez ten kwas wynosi 30%, co zgadzało się z wynikiem otrzymanym z termowagi. Jednakże Autorka stwierdziła, że jest to wynik zaniżony, ponieważ po wyprażeniu próbki (do temp. 500°C) „*w próbce zostają pochodzące z rozkładu cząsteczek organicznych węgiel i tlenek węgla(II)*”. Trudno się zgodzić z tym stwierdzeniem. Na stronie 89 Autorka słusznie stwierdza, że „*podgrzanie próbki zawierającej związku organiczne do tak wysokiej temperatury sprawia, że jej organiczna część ulega rozkładowi*”. Czy rzeczywiście w tej temperaturze pozostawałby niespalony atomowy węgiel? Badanie właściwości magnetycznych otrzymanych nanocząstek

wykazały, że magnetyzacja nasycenia w temp. 100 i 300 K jest niższa niż dla fazy objętościowej magnetytu. Autorka tłumaczy to małą masą próbki, obecnością fazy olejowej i nanometrowymi wymiarami cząstek. Niemniej jednak przytacza podobne wartości literaturowe dla takich nanocząstek (ref.129). Z kolei badania koercji magnetycznej (wielkość zewnętrznego pola magnetycznego jaką trzeba przyłożyć aby zmniejszyć do zera pozostałość magnetyczną) pozwoliły oszacować, że w temperaturze 300 K cząstki te są superparamagnetyczne, natomiast w niższej temperaturze 100K są one ferromagnetyczne. Niestety Autorce nie udało się wyznaczyć temperatury przejścia, co uzasadnia polidispersyjnością próbki. Mimo tego, na tym etapie badań stwierdziła, że otrzymane nanocząstki są odpowiednie dla utworzenia magnetoliposomów i umieszczenia ich w błonie lipidowej. Jednakże problemem stosowania tej prostej metody jest czasochłonność (około 7 godzin pracy). Dlatego Mgr Rękorajska zmodyfikowała ją, opisując jako „krótsza synteza”. Konieczność uzyskania nanocząstek w krótszym czasie wynika z możliwości stosowania w terapii izotopów o krótkim czasie życia. Krótsza metoda wytrącania nanocząstek różniła się tym, że użyto w dużym nadmiarze jonów Fe(II) w stosunku do Fe(III) przez co można było zrezygnować z czasochłonnego, jak to określa Autorka, „odtleniania” roztworu, prawdopodobnie przez przepuszczanie banieczek argonu (wzmianka w dalszej części, na str. 101). Również strącanie przeprowadzono w niższej temperaturze 25°C zamiast 45°C zmieniając procedurę dodawania amoniaku kroplami. Efektem tej metody były nanocząstki o kształcie ‘obłym’ (określenie Autorki) o większym średnim wymiarze (12.6 nm), niż poprzednie (ok. 7 nm) i większej polidispersyjności. Natomiast na podstawie dyfraktogramów określono, że są to cząstki magnetytu i maghemitu, których średnica wynosi 33 nm. Pozostałe parametry też różniły się od wartości próbki otrzymanej dłuższą metodą. Mimo tego Autorka stwierdza, że można się spodziewać, że cząstki te mogą być transportowane z krwią. Nanocząstki tlenków żelaza zmodyfikowano także kwasem cytrynowym w wyniku czego ich powierzchnia stała się hydrofilowa. Obecność kwasu na ich powierzchni potwierdzono spektroskopią w podczerwieni a wyznaczony potencjał elektrokinetyczny zeta był ujemny (-30,8 mV), świadczący o obecności na powierzchni grup -COO- pochodzących od kwasu cytrynowego. W ten sposób otrzymano stabilną koloidalną ich zawiesinę. Badania otrzymywania nanocząstek omówiłem bardziej szczegółowo, ponieważ mają one kluczowe znaczenie dla realizacji kolejnych etapów przeprowadzonych badań. Oceniając ten etap badań mogę stwierdzić, że Mgr Rękorajska przeprowadziła go w sposób bardzo przemyślany w sensie wykorzystania otrzymanego materiału do dalszych badań i w sposób rzetelny i krytyczny omówiła otrzymane wyniki.

W następnym etapie Doktorantka przeprowadziła obszerne badania nad domieszkowaniem nanocząstek tlenku żelaza jonami terbu lub gadolinu, opisane na str. 99-118. Zastosowała zarówno dłuższą jak i zmodyfikowaną krótszą metodę strącania cząstek oraz czasochłonną metodę odwróconej miceli woda/olej (W/O), która zakończyła się częściowym sukcesem ale wystąpił szereg problemów, jak agregacja cząstek i częściowo pręcikowaty ich kształt, problem usunięcia surfaktantu, brak wytrącania nanocząstek przy 12,8% molowych zawartości terbu, nieodpowiednie właściwości magnetyczne i inne. Sukcesem zakończyło się zastosowanie metody krótszej strącania nanokryształków o zawartości 2,5% lantanowców (mniej niż 4 godziny, powtarzalne wyniki), które były superparamagnetyczne, o małej polidispersyjności, wystarczającej wartości magnetyzacji nasycenia i pola koercji. Pozwalało to wnioskować Autorce o potencjalnej ich użyteczności w radioterapii celowanej. Średnice cząstek, ich parametry sieciowe i właściwości magnetyczne dla różnych zawartości terbu i gadolinu zestawiono w tabelach 3.3, 3.4 i 3.5. Należy wyrazić uznanie Mgr Rękorajskiej za tak obszerne i dociekliwe przeprowadzenie tych badań oraz analityczną dyskusję otrzymanych wyników.

Ważnym zagadnieniem było określenie wpływu obecności hydrofobowych cząstek tlenków żelaza na elastyczność dwuwarstwowej błony lipidowej. W badaniach składała się ona z dwu fosfolipidów DPPC (nasycony) i DOPC (nienasycony). Wpływ hydrofobowych cząstek był

dotychczas mniej badany niż cząstek hydrofilowych. Metodą elektrostrykcji (zmiana pojemności elektrycznej błonki osadzonej w małym otworku) i AFM (dwuwarstwa osadzona na powierzchni miki) wyznaczyła moduły Younga tych dwu różnych dwuwarstw, których wartości różniły się zasadniczo, ale ich zmiany wskazywały, że w obu przypadkach następowało usztywnienie błony i zmiana jej struktury. Zmiany te ułatwiają pękanie błony pod działaniem naprężeń mechanicznych, co jest istotne w terapii celowanej.

Dalsza część pracy doktorskiej dotyczy otrzymywania („syntezy” według Autorki) liposomów mieszaniny fosfolipidu nasyconego DPPC i nienasyconego DOPC (molowo 3:1) i umieszczania w nich doksorubicyny. Doktorantka zastosowała znaną metodę rozpuszczenia lipidów w chloroformie i jego odparowanie z dodatkiem antybiotyku, tzw. „ładowanie bierne”, lub bez dodatku - „ładowanie aktywne” w wyniku wytworzenia gradientu pomiędzy wnętrzem liposomu pH=4 i otaczającym roztworem doksorubicyny w buforze fosforanowym o pH =7 (Rys.3.25). Obie metody dawały podobne rezultaty jednowarstwowych liposomów. Z replik TEM ich wielkość wynosiła aż 420 nm, mimo, że pęcherzyki były przeciskane 11 razy przez membranę poliwęglanową o średnicy porów 100 nm. Tak duża ich średnica „może dziwić” jak pisze Autorka i wysuwa hipotezę, że pęcherzyki liposomów mogą wysychać i spłaszczać się na siatce mikroskopu przed pomiarem. Niestety nie miała dostępu do mikroskopu CRYO-TEM. Potwierdzeniem tej hipotezy są wielkości otrzymane metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS), 108 ± 5 nm bez DOX i 112 ± 8 nm jeśli zawierały lek. Wyniki te wskazują, że doksorubicyna praktycznie nie zwiększa średnicy liposomów i są one homogenicznie rozmieszczone w próbce.

Następnie Mgr Rękorajska wykonała bardzo ważne eksperymenty umiejscowienia w liposomach, zarówno bez jak i z doksorubicyną, cząstek magnetycznych mających powierzchnię hydrofobową (z kwasem oleinowym) lub hydrofilową (z jonami kwasu cytrynowego). Procedura była analogiczna do metodyki otrzymywania czystych liposomów i z zamkniętą doksorubicyną. Stosując TEM i DLS wykazała, że hydrofobowe nanocząstki mimo małej dodanej ich ilości (5% wagowo) wbudowując się w dwuwarstwę liposomu agregowały (Rys.3.28, str.132). Ich rozkład był niejednorodny a średnia wielkość wyznaczona metodą DLS wynosiła 105 ± 11 nm i 118 ± 14 nm, odpowiednio bez i z doksorubicyną. Doktorantka wykazała przy pomocy stałego magnesu, że mimo tak małej ilości nanocząstek magnetycznych liposomy zdyspergowane w cieczy gromadzą się w pobliżu magnesu (brunatny kolor) a po usunięciu pola magnetycznego układ łatwo dawał się zhomogenizować. W liposomach zawierających hydrofilowe nanocząstki były one rozłożone równomiernie i nie były zagregowane a wielkość pęcherzyków wyznaczona DLS była 97 ± 7 nm, i co więcej, średnica wyznaczona z TEM wynosiła tylko 130 nm. Potwierdziło to tezę Doktorantki o ‘wysychaniu liposomów’ i spłaszczaniu na siatce mikroskopu przez co ich średnica drastycznie wzrasta. W tym przypadku nie tracą one swego kształtu ze względu na obecność wewnątrz nanocząstek tlenku żelaza. Wyniki ilości doksorubicyny umieszczonej w badanych trzech typach liposomów metodą bierną i aktywną zestawione są Tabeli 3.8 (str.138). Wynika z niej, że metodą aktywną (gradient pH) można w liposomach bez nanocząstek lub jeśli są one hydrofobowe umieścić więcej DOX, co nie potwierdziło się w obecności nanocząstek hydrofilowych, ponieważ przy pH = 4, koniecznym wewnątrz liposomu, następuje reakcja nanocząstek co objawia się pojawieniem koloru pomarańczowego.

Dalszym logicznym etapem było zbadanie kinetyki uwalniania się doksorubicyny z liposomów. W tym celu Mgr Rękorajska stosowała metodę elektrochemiczną i fluorescencyjną. Bez zewnętrznych czynników z liposomów z hydrofobowymi nanocząstkami (MLP@OA) po upływie godziny uwalniała się praktycznie maksymalna ilość leku i tylko 4,3 – 5,3 % (Rys.3.33, str.140). Natomiast działanie zmiennego pola magnetycznego już po 0,5 h powodowało uwolnienie 40-50% doksorubicyny. Wskazywało to, że zmienne pole magnetyczne niszczy magnetoliposomy, co potwierdziły także obrazy z TEM (Rys. 3.35), na których widać, że po 1,5 h jego działania wszystkie magnetoliposomy zostały zniszczone. Autorka słusznie wyprowadza

ważny wniosek, że zmieniając natężenie i czas działania pola magnetycznego można będzie kontrolować kinetykę uwalniania leku. Ponadto, po usunięciu pola dokсорubicyna nadal wypływała ze zniszczonych liposomów, w przeciwieństwie do cytowanych przez Autorkę doniesień literaturowych, gdzie rozpatrywano inny mechanizm uwalniania leku. W przypadku magnetoliposomów z hydrofilowymi nanocząstkami tlenków żelaza (MLP@CA) w ich wnętrzu proces naturalnego uwalniania leku był znacznie wolniejszy niż poprzednio, prawdopodobnie w wyniku oddziaływań elektrostatycznych ujemnie naładowanych nanocząstek i jonów dokсорubicyny. Dopiero po upływie 2,5 godziny osiąga plateau 4%, przy czym powtarzalność pomiarów była mniejsza. Natomiast w obecności pola magnetycznego Autorka obserwowała natychmiastowe uwalnianie leku, ale jego ilość po ok. 2 h wynosiła tylko 9%. W tym układzie obraz TEM pokazał, że znajdują się struktury (0,3 – 1 μm) mieszaniny lipidu i nanocząstek, przy czym pozostaje część pęcherzyków liposomów o zmienionych większych strukturach. Autorka sugeruje, że dokсорubicyna uwalniana jest tylko w czasie reorganizacji magnetoliposomów i przez to obserwowana szybkość jej uwalniania jest tak powolna. Jej konkluzja jest taka, że tego typu magnetoliposomy są gorszym nośnikiem leku niż zawierające hydrofobowe cząstki magnetyczne.

Finalny etap badań polegał na przebadaniu uwalniania dokсорubicyny z magnetoliposomów z hydrofobowymi nanocząstkami MLP@OA (5%) na zdrowych i nowotworowych nabłonkowych komórkach piersi, które Autorka przeprowadziła wspólnie z doktorantką z Politechniki Warszawskiej. Stwierdzono, że po godzinie zmienne pole magnetyczne nie miało wpływu na komórki zdrowe podczas gdy znacząco wzrosła cytotoxyczność komórek rakowych. Wyniki te są znaczącą wartością podsumowującą całość przeprowadzonych badań w ramach dysertacji doktorskiej.

Mgr Rękorajska kończy rozprawę wnioskami, gdzie najpierw w punktach podsumowuje najważniejsze wyniki i osiągnięcia i wyprowadza kilka istotnych wniosków. Najważniejsze jest to, że zewnętrzne zmienne pole magnetyczne niszczy strukturę magnetoliposomów powodując uwalnianie leku a nie tylko działa jako efekt hipertermii magnetycznej, można je wprowadzać w okolice guza nowotworowego (terapia celowana stałym polem magnetycznym) zamiast do krwioobrotu i wtedy uwalniać przy pomocy zewnętrznego zmiennego pola magnetycznego.

Ocena edycji pracy

Praca napisana jest w dobrym stylu naukowym, którą dobrze się czyta. Jest podzielona na odpowiednie paragrafy, które łatwo znaleźć w spisie treści. Oczywiście, że zadaniem recenzenta jest wykazanie uchybień w ocenianej pracy, nie tylko merytorycznych, ale i edycyjnych. Autorka używa w pracy dużo akronimów pochodzących od anglojęzycznych terminów i niestety obecnie jest to powszechnie przyjęte w publikacjach. Zostały one zestawione na początku pracy jako „Wykaz skrótów...”, ale nie są to skróty, tylko właśnie akronimy lub też inaczej nazywane „skrótownice”. W tym wykazie nie są one ułożone alfabetycznie tylko prawdopodobnie w kolejności ukazywania się w tekście pracy, co trochę utrudnia znalezienie ich znaczenia w Wykazie. Druga uwaga dotyczy tytułu pracy, gdzie użyto terminu „synteza”, jak również wszędzie w tekście pracy, co już dyskutowałem wcześniej, że to nie jest synteza. Osobiście nie podoba mi się także termin „... w konstrukcji liposomalnych nośników...” Konstruuje się dom, drogę, maszynę i mimo, że w gramatyce używa się terminu ‘konstrukcja zdania’, to w tym przypadku wolałbym użycie ‘w otrzymywaniu’. Na rysunkach pokazujących odwzorowania powierzchni z mikroskopu elektronowego bądź z mikroskopu atomowego oraz w tekście, Autorka określa je jako *zdjęcia*, co nie jest poprawne, ponieważ zdjęcia uzyskuje się z aparatu fotograficznego lub mikroskopu optycznego. Z wymienionych aparatów otrzymujemy ‘obraz’, ‘odwzorowanie’ bądź ‘replikę’ powierzchni. W pracy, prawie wszędzie, Doktorantka używa spójnika „czy”, lepiej byłoby w niektórych zdaniach użyć ‘lub, albo’. Str. 41, 81, 88 – podawanie wielkości w nanometrach, a tym

bardziej w Å, z dokładnością do dziesięciotysięcznych lub nawet milionowych części Å nie ma uzasadnienia fizycznego.

Jest też kilka zdań, które wymagają korekty stylistycznej, gramatycznej lub drukarskiej. Jedno już wymieniłem, dotyczące celu pracy (str.5). Na str.18 zdanie zaczynające się od „Ze względu na wygaśnięcie patentu.....powszechnie dostępne są informacje dotyczące sposobu w rozdziale 1.5.3 przygotowania tego typu pęcherzyków”. Str.45 - „...możliwe jest otrzymanie również nanocząstek o kwadratowym kształcie”, może raczej o kształcie sześciennym lub prostopadłościennym? Str.49 - „i ma na celu poprawę ich skuteczność”. Str.65 - „...przenieść monowarstwę rozprężoną na powierzchni wody...” - co to znaczy monowarstwa rozprężona? Str. 67 - „...niewielki otwór., który przed eksperymentami powinien zostać nasmarowany roztworem lipidów...”, czy otwór można nasmarować? Str.87 - „Ze względu na niewielki rozmiar badanych ziaren....otrzymany wzór dyfrakcyjny jest dosyć zaszumiony...”. Str. 111 - „W literaturze natomiast podobna zawartość domieszki terbu ulega wbudowaniu...”. Str.119 - „Ich syntezę (cząstki IONP) opisano w paragrafie 12a” - gdzie jest ten paragraf? Str.120 - Autorka opisując badania elektrostrykcji (zmiana wymiarów pod wpływem pola elektrycznego), stwierdza, że „wielokrotnie (minimum 5-krotnie) wytwarzano membrany o danym składzie.... (DPPC + DOPC + IONP)...powtarzanie tego rodzaju eksperymentów jest konieczne....proces tworzenia membran zależy od bardzo wielu czynników, z których nie wszystkie można łatwo kontrolować, a w ten sposób można ograniczyć ich wpływ”. Otóż w ten sposób nie ograniczymy ich wpływu a jedynie uśrednimy występujące zmienne parametry.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując powyższą ocenę rozprawy doktorskiej Mgr Aleksandry Rękorajskiej mogę stwierdzić, że jest to niewątpliwie praca wyróżniająca się, zarówno aktualnością tematyki badawczej, jej zakresem jak i dużym potencjałem poznawczo-aplikacyjnym. Wymienione wyżej usterki są natury techniczno-językowej lub żargonu naukowego i nie wpływają one na wartość merytoryczną uzyskanych wyników i pracy doktorskiej jako całości. Interdyscyplinarny charakter pracy doktorskiej Mgr Aleksandry Rękorajskiej tym bardziej podnosi jej walory naukowe i poznawcze. Wyniki opisane w rozprawie są opublikowane w 4 pracach w czasopismach naukowych o liczącym się poziomie i dotychczas były cytowane 61 razy, a w tym roku już 12 razy (*Web of Science*). Doktorantka zrealizowała wszystkie zadania badawcze zawarte w tytule pracy i co więcej sprawdziła *in vitro* ich użyteczność na żywych komórkach. Wyniki te otwierają drogę do dalszych badań w celu możliwości ich wykorzystania *in vivo*. W świetle powyższego jednoznacznie stwierdzam, że zgodnie z Ustawą z dn. 14 marca 2003 roku, art. 13, o stopniach i tytule naukowym, praca doktorska Mgr Aleksandry Rękorajskiej spełnia z nadmiarem wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego wnioskuję do Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o jej przyjęcie i przeprowadzenie dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie biorąc pod uwagę poziom naukowy rozprawy, uzyskane wyniki i ich potencjalne zastosowanie, oraz interdyscyplinarność badawczą Mgr Aleksandry Rękorajskiej, proponuję wyróżnienie pracy doktorskiej nagrodą.

E. Chłedowski

Lublin, dn.14.09.2020

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

Po dokładnym zapoznaniu się z pracą doktorską Mgr Aleksandry Rękorajskiej z przyjemnością wnoszę o jej wyróżnienie odpowiednią nagrodą. Mój wniosek wynika z następujących powodów:

- 1) Całkowicie zrealizowała tematykę pracy doktorskiej, która była interdyscyplinarna i uzyskała pozytywne wyniki.
- 2) Tematyka pracy jest bardzo aktualna ponieważ dotyczy opracowania tzw. celowanych nośników leków przeciwnowotworowych, które przy pomocy zewnętrznego stałego pola magnetycznego można skierować w odpowiednie miejsce, np. guza nowotworowego, a następnie uwolnić lek zmiennym polem magnetycznym. W ten sposób można byłoby bardzo ograniczyć uboczne skutki podawania leku do krwioobiegu.
- 3) Doktorantka uzyskała pozytywne wyniki utworzenia takich nośników w postaci magnetoliposomów z zamkniętym wewnątrz lekiem doksorubicyną.
- 4) Przeprowadziła badania *in vitro* na żywych nabłonkowych komórkach piersi, które pokazały możliwość skuteczności *in vivo* stosowania takiej terapii.
- 5) Uzyskane wyniki otwierają obszary do dalszych badań nad doskonaleniem tego typu nośników leków, nie tylko przeciwnowotworowych.
- 6) Wyniki opisane w rozprawie doktorskiej zostały już opublikowane w czterech pracach naukowych w liczących się czasopismach o cyrkulacji międzynarodowej i mimo, że były opublikowane w ostatnich dwu latach, to były już cytowane 61 razy, a w bieżącym roku 12 razy.
- 7) Praca Mgr Aleksandry Rękorajskiej, zarówno część literaturowa jak i doświadczalna, opis uzyskanych wyników i ich dyskusja, świadczą, że jest Ona dojrzałym pracownikiem naukowym. W dalszej działalności naukowej z pewnością osiągnie znaczącą pozycję w dziedzinie badań nowoczesnych terapii przeciwnowotworowych.

Dlatego z pełnym przekonaniem uważam, że Jej praca doktorska zasługuje na wyróżnienie.

E. Chibowski