

Gliwice, 05.07.2021 r.

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Mierzwy pt:
„Lipidowe ciekłokrystaliczne materiały hybrydowe w formie fazy kubicznej lub magnetokubosomów jako nośniki leku”

Jednym z wyzwań stojących przed współczesną medycyną jest zaprojektowanie nośników leków umożliwiających dostarczenie terapeutycznych ilości substancji leczniczej bezpośrednio do miejsca wymagającego leczenia. Jest to niezwykle istotne, bowiem podawanie leków w sposób tradycyjny (leczenie systemowe) często prowadzi do sytuacji, w której narażone na działanie leku są również zdrowe tkanki. Sytuacja staje się problematyczna, gdy stosowane są leki o silnym działaniu cytotoksycznym, jak to ma miejsce w przypadku leczenia onkologicznego. Wtedy nieodpowiednia biodystrybucja leku w organizmie prowadzi do pojawienia się poważnych efektów ubocznych, do których należą m.in. mielosupresja, niedokrwistość, neutropenia, trombocytopenia, nudności i zmęczenie.

W swojej pracy doktorskiej, Pani mgr Monika Mierzwa zajęła się projektowaniem hybrydowych nanomateriałów opartych o monooleinowe układy ciekłokrystaliczne oraz nanocząstki magnetyczne, które posłużyły jako nośniki dla dwóch modelowych leków stosowanych w chemioterapii onkologicznej, tj. doksorubicyny (Dox) oraz metotreksatu (MTX). Pani mgr Monika Mierzwa wykonywała badania w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrod Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Renaty Bilewicz. Przedmiot badań prowadzonych przez Panią Mierzwę jest nowatorski i całkowicie spełnia warunek oryginalności naukowej stawiany pracom doktorskim.

Praca doktorska Pani mgr Moniki Mierzwy ma układ klasyczny. Praca liczy, wraz ze spisem cytowanej literatury, 160 stron, a tekst został podzielony na 8 rozdziałów (nie uwzględniając odnośników literaturowych). Po krótkim wstępie i przedstawieniu celu pracy, Pani Mierzwa prezentuje liczący 55 stron przegląd literatury. Następnie prezentowana jest część eksperymentalna (13 stron) oraz część poświęcona opisowi wyników badań (50 stron). Pracę zamyka podsumowanie, streszczenie, a także spis dorobku Doktorantki, tj. publikacji naukowych i wystąpień konferencyjnych. Bibliografia liczy 154 pozycje.

Praca napisana jest poprawnie, chociaż znajdują się w niej szereg drobnych błędów, jak np. powtórzenia („Obrazowy schemat eksperymentu SAXS przedstawiono na schemacie 3.5.”, strona 67), niepotrzebne spacje w nazwach związków chemicznych (np. „wodorofosforan (V) sodu” zamiast „wodorofosforan(V) sodu”, strona 12), czy niezręczności stylistyczne (np. „Zapewnienie odpowiedniej biodystrybucji leku umożliwia zastosowanie nośników leków.”, strona 15), określenie nanocząstek NPC raz jako hydrofilowych, a raz jako hydrofobowych (strona 92), jak również nieprawidłowa odmiana przez przypadki nazwisk zagranicznych. Uważam również, że tytuł pracy lepiej oddawałby jej treść, gdyby zamiast sformułowania „nośniki leku” użył liczby mnogiej, tj. „nośniki leków” (z uwagi na wykorzystanie w badaniach dwóch substancji: Dox oraz MTX).

Ogólnie jednak bardzo dobrze oceniam rozprawę od strony formalnej i edytorskiej; jej tekst czyta się z zainteresowaniem, a rysunki są opracowane w sposób staranny i czytelny.

Pierwszy i najdłuższy podrozdział przeglądu literaturowego (23 strony) ma w dużej mierze charakter podręcznikowy, tzn. zebrane są w nim podstawowe wiadomości dotyczące układów ciekłokrystalicznych ze szczególnym uwzględnieniem faz kubicznych. Pewien niedosyt pozostawia fakt, że podrozdział opisujący lipidowe matryce ciekłokrystaliczne wykorzystywane do przechowywania i transportu leków (3.1.6.3) liczy zaledwie 1 stronę i nie ma w nim ani jednego odnośnika do wyników badań eksperymentalnych. Na szczęście tematyka wykorzystania lipidowych matryc ciekłokrystalicznych, zawężona do opisu fazy kubicznej, poruszona jest jeszcze raz, tym razem bardziej dogłębnie, w rozdziale dotyczącym wykorzystania faz i nanocząstek lipidowych w badaniach leków (3.3). W rozdziale tym przywołana jest publikacja E. Nazaruk, A. Majkowska-Pilip, and R. Bilewicz — *Lipidic Cubic-Phase Nanoparticles—Cubosomes for Efficient Drug Delivery to Cancer Cells, Chempluschem, vol. 82, no. 4, pp. 570–575, 2017* (odnośnik 69), w której opisane jest unieruchamianie i uwalnianie Dox z kubosomów. W związku z tym, że temat wspomnianej pracy częściowo pokrywa się z tematyką pracy doktorskiej Pani mgr Mierzwę, Autorka powinna wyraźnie zaznaczyć różnice pomiędzy swoimi badaniami i badaniami opisanymi w cytowanej pracy [69]. Ponadto, warto byłoby rozszerzyć dyskusję wyników uzyskanych przez Autorkę z wynikami przedstawionymi w tej publikacji [69]. Podobna uwaga dotyczy publikacji przywołanej później, w rozdziale dotyczącym doksorubicyny (3.5.1): M. Godlewska, A. Majkowska-Pilip, A. Stachurska, J. F. Biernat, D. Gawe, and E. Nazaruk, — *Voltammetric and biological studies of folate-targeted non-lamellar lipid mesophases, Electrochimica Acta vol. 299, pp. 1–11, 2019* (odnośnik 90).

W kolejnym podrozdziale przeglądu literaturowego Autorka opisuje wybrane modele kinetyki uwalniania leków. Oprócz krótkiego wyjaśnienia mechanizmów uwalniania leków odpowiadających danym modelom kinetycznym, dla każdego z nich Autorka zamieszcza również jego opis matematyczny. Podrozdziały opisujące leki wykorzystane w pracy, tj. Dox (3.5.1) oraz MTX (3.5.2) są związane i skupiają się głównie na mechanizmie działania leków i ich cytotoksyczności. Chociaż bardzo wyraźnie zaznaczona została potrzeba opracowania nośników leków, które mogłyby przyczynić się do zmniejszenia efektów ubocznych terapii, to przykłady stosowanych nośników pojawiające się w literaturze zostały jedynie wymienione. Rozdział 3.5 bardzo zyskałby, gdyby pojawiła się w nim, np. tabela przedstawiająca właściwości wzmiankowanych nośników, jak chociażby ich pojemność na lek (Dox, MTX) oraz podstawowe informacje dotyczące kinetyki uwalniania. Ponadto, w rozdziale 3.5 powinna pojawić się informacja o tym, jaka jest terapeutyczna dawka obu leków oraz jak powinien wyglądać profil ich uwalniania. Bardzo istotne jest bowiem, aby stężenie leków przeciwnowotworowych w trakcie trwania leczenia było utrzymywane na odpowiednim poziomie w celu zapewnienia jego skutecznego działania nie tylko względem komórek wrażliwych, ale również lekoopornych (polecam artykuł *Kozłowska E. et al. Mathematical model predicts response to chemotherapy in advanced non-resectable non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet, PLoS Computational Biology 2020, 16, 10, e1008234*).



Kolejne podrozdziały opisują metody badawcze stosowane w pracy, tj. woltamperometrię cykliczną (CV), woltamperometrię pulsową różnicową (DPV), woltamperometrię fali prostokątnej (SWV), spektroskopię UV-Vis, spektroskopię rozproszenia rentgenowskiego pod małymi kątami (SAXS), metodę dynamicznego rozpraszania światła (DLS), mikroskopię elektronową (EM) oraz pomiary magnetyczne. Metody te opisane są w sposób krótki i jednocześnie zwięzły, prezentując najistotniejsze informacje. Nie mogę jedynie zgodzić się ze stwierdzeniem, że mikroskopia TEM „dostarcza szczegółowych informacji o składzie chemicznym próbki” oraz „jest używana do charakterystyki powierzchni” (strona 72). Jest to zbyt duże uproszczenie, mikroskop do przeprowadzenia takich pomiarów wymaga wyposażenia w szereg dodatkowych detektorów, np. EDS.

Ogólnie część literaturowa zasługuje na bardzo dobrą ocenę, gdyż Autorka dokonała wyczerpującego przeglądu, obejmującego sto sześć pozycji literaturowych i wykazała się szeroką wiedzą dotyczącą zarówno badanych materiałów jak i metod badania ich właściwości.

Część eksperymentalną pracy doktorskiej Pani mgr Mierzwy rozpoczyna opis aparatury pomiarowej i odczynników chemicznych. Następnie pojawia się opis otrzymywania i charakterystyka nanocząstek magnetycznych, które zostały zsyntezowane przez współpracowników Autorki. W podrozdziale 4.4 szczegółowo opisana jest procedura przygotowania faz kubicznych. Korzystając z diagramu fazowego, Autorka wyznaczyła odpowiedni stosunek lipidu do rozpuszczalnika, co umożliwiło jej otrzymanie pożądanej struktury kubicznej. Pani mgr Mierzwa dokładnie opisuje przygotowanie faz kubicznych zawierających lek, jednak nie wspomina, w jaki sposób zostało zoptymalizowane jego stężenie. W pracy opisana jest synteza faz zawierających 0,25 %, 0,5 %, 1 % oraz 2 % wag. leku. Czy był parametr, który ograniczał pojemność nośnika na lek?

Zgodnie z informacjami podanymi w podrozdziale 4.5.1, kubosomy przygotowano na dwa sposoby. Pierwszy sposób polegał na dodaniu Pluronicu F-127 do fazy kubicznej, a następnie wykorzystaniu ultradźwięków. Drugi sposób polegał na tzw. „przygotowaniu próbki od podstaw”. W pracy nie znalazłam, niestety, porównania efektywności obu metod. Podobnie jak w przypadku otrzymywania kubosomów, dwie analogiczne metody wykorzystano także do otrzymania magnetokubosomów. Również w tym przypadku brak jest informacji o zaletach i wadach obu metod. Zarówno w przypadku kubosomów jak i magnetokubosomów maksymalne stężenie leku wynosiło zaledwie 0,05 % wag. Co było przyczyną konieczności zmniejszenia stężenia leków?

Część dotyczącą badań własnych Autorki rozpoczyna szczegółowa charakterystyka strukturalna faz kubicznych z wykorzystaniem takich narzędzi jak spolaryzowana mikroskopia optyczna, kriogeniczna mikroskopia elektronowa oraz SAXS, które pozwoliły na bezpośrednią obserwację różnych faz układu ciekłokrystalicznego, określenie grup przestrzennych i parametrów strukturalnych, jak również dostarczyły informacji o nanocząstkach. Zgodnie z wynikami badań Autorki, obecność 0,5 % wag. Dox w mezofazie nie wpłynęła na wartość parametru komórki elementarnej, wielkość kanałów wodnych ani grubość warstwy lipidowej fazy, świadcząc o tym, że Dox z łatwością może być wbudowana w strukturę fazy kubicznej. Dodatek MTX nieznacznie wpłynął na parametry strukturalne mezofazy, a różnice zostały wytłumaczone pęcznieniem komórki elementarnej wywołanym obecnością leku. Charakterystyka strukturalna faz kubicznych domieszkowanych lekami została wykonana dla układów zawierających 0,5 % Dox, a także 1 % i 2 % MTX. Bardzo interesującym byłoby sprawdzenie, jak zmienia się struktura mezofazy przy wyższych stężeniach leków, czy przypadkiem pęcznienie nie wynika z 2-4 krotnie większej ilości MTX w stosunku do Dox.

Zaletą pracy Pani mgr Mierzwy jest umieszczenie w niej częściowych diagramów fazowych dla układów hybrydowych, zawierających 2 % wag. hydrofilowych oraz hydrofobowych nanocząstek magnetycznych, wyznaczonych w oparciu o wyniki pomiarów SAXS oraz mikroskopii polaryzacyjnej. Obecność hydrofilowych nanocząstek magnetycznych w sposób znaczący zmieniła przebieg diagramu fazowego dla układu monooleina-woda. Takie zmiany są niezwykle istotne przy projektowaniu nośników leków, ponieważ zmiana fazy ma duży wpływ na kinetykę uwalniania substancji aktywnej.



Kolejny rozdział pracy poświęcony jest elektrochemicznej charakterystyce faz kubicznych, a rozpoczyna go dokładny opis reakcji elektrodowych Dox oraz MTX. Następnie Autorka opisuje wyniki bardzo interesującego eksperymentu, jakim jest nasycanie fazy kubicznej lekiem z roztworu oraz monitorowanie tego procesu za pomocą technik CV/DPV/SWV. Badania wykazały, że faza kubiczna została nasycona lekiem po 9 godzinach w przypadku Dox (z roztworu zawierającego 0,1 mM Dox) i po 8 godzinach w przypadku MTX (z roztworu zawierającego 2,33 mM MTX). Samo nasycenie rozumiane jest jako sytuacja, w której roztwór leku i mezofaza znajdują się w równowadze. Jakie jest jednak znaczenie praktyczne tego terminu? Czy odpowiada on zapelnieniu kanałów wodnych fazy kubicznej? Czy można go powiązać z jednym z etapów uwalniania leku? W pracy brak jest krzywej kalibracyjnej wiążącej wysokość prądów wybranych pików CV/DPV/SWV ze stężeniem leków, którą należałoby wykorzystać do oszacowania stężenia leków w nasyconej fazie kubicznej.

Istotnym elementem pracy doktorskiej jest analiza procesu uwalniania leków z fazy kubicznej. Zgodnie z częścią eksperymentalną warunki uwalniania Dox i MTX różniły się od siebie. Uwalnianie Dox zostało przeprowadzone w naczynku elektrochemicznym o pojemności 10 ml, a elektroda na której znajdowała się faza kubiczna miała powierzchnię 0,07 cm². Uwalnianie MTX zostało przeprowadzone w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej równej 1 cm. Z uwagi na znacznie mniejszą objętość roztworu, do którego uwalniany był MTX, należy rozważyć, czy zachowane zostały warunki nasycenia zwane z języka angielskiego „sink conditions”, t.j. czy objętość roztworu do uwalniania była min. 3 do 10 razy większa niż objętość nasycenia.

Ponadto, uwalnianie Dox miało miejsce w roztworze o pH kwaśnym (5,4), a MTX w roztworze o pH fizjologicznym (7,4). Autorka we wstępie sama wskazuje, na różnice w pH komórek zdrowych i nowotworowych, które często wykorzystywane są przy projektowaniu leków. W chemioterapii korzystne jest, aby nośniki leków wykazywały zwiększone ich uwalnianie przy pH odpowiadającym środowisku komórek rakowych (zazwyczaj przyjmuje się pH 5,4). Chociaż Autorka w sposób przekonujący uzasadniła dobór warunków procesu uwalniania, powołując się na elektrochemię MTX, to jednak porównanie uwalniania obu leków w środowisku zarówno kwaśnym i fizjologicznym byłoby bardzo wartościowe pod kątem wykorzystania struktur opracowanych przez Panią mgr Mierzwę w chemioterapii. Dodatkowym argumentem jest fakt, że Pani mgr Mierzwa w jednej ze swoich prac (odnośnik 130) udowodniła już, że uwalnianie Dox z ciekłokrystalicznej fazy kubicznej odbywa się sześć razy szybciej w pH 5,8 niż w pH 7,4.

Badania uwalniania leków prowadzone były w sposób uporządkowany, dla różnych układów w różnych warunkach. Autorka wykonała szereg eksperymentów, w których określiła kinetykę uwalniania leków z następujących układów:

- Dox (0,5 % wag.) w fazie kubicznej, 25 °C, pH 5,8
- MTX (0,25%, 0,5%, 1% wag.) w fazie kubicznej, 25 °C oraz 37 °C, pH 7,4 (choć przygotowano również próbkę zawierającą 0.1 % wag. MTX, dla której jednak nie przeprowadzono badania uwalniania leku)
- Dox (0,5 % wag.) w fazie kubicznej zawierającej hydrofobowe nanocząstki magnetyczne (0,2 % wag.), 25 °C, pH 5,8
- Dox (0,5 % wag.) w fazie kubicznej zawierającej hydrofobowe nanocząstki magnetyczne (2 % wag.), 25 °C, 37 °C, 44 °C, pH 5,8
- Dox (0,5 % wag.) w fazie kubicznej zawierającej hydrofilowe nanocząstki magnetyczne (0,2 %), 25 °C, pH 5,8
- Dox (0,5 % wag.) w fazie kubicznej zawierającej hydrofilowe nanocząstki magnetyczne (2 % wag.), 25 °C, 37 °C, 44 °C, pH 5,8
- MTX (0,5 % wag.) w fazie kubicznej zawierającej hydrofobowe nanocząstki magnetyczne (2 % wag.), 25 °C, pH 7,4

Powyższe zestawienie wyraźnie pokazuje ogrom pracy wykonanej przez Panią mgr Mierzwę, która przeanalizowała (z co najmniej trzema powtórzeniami), proces uwalniania leków z 16 układów. Dla każdego z układów została wyznaczona kinetyka uwalniania, a także został zaproponowany mechanizm tego procesu. Za każdym razem Autorka skrupulatnie odnotowywała czas potrzebny na uwolnienie 50 % unieruchomionego leku (T_{50}). W niektórych przypadkach uwalnianie było na tyle wolne, że w trakcie trwania eksperymentu czas T_{50} nie został osiągnięty. Nic nie stoi jednak na przeszkodzie, aby w tym przypadku T_{50} został oszacowany na podstawie opracowanego modelu kinetycznego. Przyznam, że w tym rozdziale brakowało mi porównania eksperymentalnych profili uwalniania leków z profilami opisywanymi przez zaproponowane/wyznaczone modele kinetyczne, aby zweryfikować ich poprawność.

Następna część pracy Pani mgr Mierzwy dotyczy charakterystyki strukturalnej kubosomów i magnetokubosomów. Zarówno hybrydowa mezofaza jak i magnetokubosomy okazały się wrażliwe na działanie pola magnetycznego i wykazywały ruch cząstek w kierunku magnesu. Potwierdziło to, że właściwości magnetyczne nanocząstek są zachowane w układach rozproszonych, co oznacza, że można je rozważać jako układy do celowanego dostarczania leków. Doświadczeniem weryfikującym hipotezę o możliwości wykorzystania magnetokubosomów jako sterowanych nośników leków było badanie uwalniania Dox i MTX w polu magnetycznym z magnetokubosomów zawierających hydrofobowe nanocząstki magnetyczne. Zastosowanie zmiennego pola magnetycznego o niskiej częstotliwości okazało się stymulować uwalnianie leków z magnetokubosomów, pozwalając na ich całkowite uwolnienie w czasie zaledwie 10 i 30 minut, odpowiednio dla MTX i Dox. Autorka wyjaśnia zaobserwowany efekt mechanicznymi wibracjami nanocząstek magnetycznych, które mogą rozerwać wewnętrzną strukturę magnetokubosomów. Niestety, nie zostało to udowodnione eksperymentalnie, chociaż mając do dyspozycji SAXS można byłoby zbadać strukturę magnetokubosomów po przeprowadzeniu procesu uwalniania leków.

Pewnym mankamentem prezentacji wyników uwalniania leków jest to, że profile wymywania zostały przedstawione z wykorzystaniem różnych parametrów. Profil wymywania Dox przedstawiony jest jako zmiana gęstości prądu w czasie, profil wymywania MTX przedstawiony jest jako zmiana stężenia leku w czasie, natomiast profile wymywania zaprezentowane we wcześniejszych fragmentach pracy są przedstawione jako zmiana stosunku prądu (I/I_0) bądź % leku w czasie. Jeżeli celem pracy doktorskiej jest projektowanie materiałów, które mają służyć jako nośniki leków, to profile uwalniania powinny umożliwić stwierdzenie, w jakim czasie osiągnięte zostanie stężenie terapeutyczne leku oraz jak długo będzie się ono utrzymywać. Przyjmując, że cytotoksyczność (LC_{50}) względem komórek AGS wynosi 0,2 μM dla Dox i 50 μM dla MTX (Florou *et al.* *Effect of doxorubicin, oxaliplatin, and methotrexate administration on the transcriptional activity of BCL-2 family gene members in stomach cancer cells, Cancer Biology & Therapy* 2013, 14, 587-596), proponuję, aby Autorka wyselekcjonowała spośród otrzymanych przez siebie nośników te, które zapewnią uwolnienie terapeutycznej ilości leków. Jestem ciekawa, ile magnetokubosomów potrzeba, aby uzyskać stężenie terapeutyczne MTX, który charakteryzuje się zdecydowanie niższą cytotoksycznością od Dox.

W podsumowaniu recenzji chcę podkreślić bardzo wysoki poziom badań przeprowadzonych przez Panią mgr Mierzwę. Imponująca jest ilość wyników opisanych w pracy doktorskiej, świadcząca o bardzo dużym nakładzie czasu i pracy Autorki. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w 3 publikacjach, przy czym w dwóch z nich Pani mgr Mierzwa jest pierwszym autorem. Chciałabym podkreślić, że uwagi krytyczne zawarte w recenzji mają charakter dyskusyjny i w niczym nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej. Stwierdzam, że rozprawa Pani mgr Moniki Mierzwy pt. „Lipidowe ciekłokrystaliczne materiały hybrydowe w formie fazy kubicznej lub magnetokubosomów jako nośniki leku” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określonym w ustawie o tytule i stopniach naukowych i zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Moniki Mierzwy do dalszych etapów przewodu doktorskiego, tj. publicznej dyskusji nad rozprawą.

Ponadto, ze względu na wysoką ocenę wartości naukowej rozprawy i znaczący dorobek naukowy, zgłaszam wniosek o uznanie jej za wyróżniającą.

Katarzyna Kulwiec

Gliwice, 05.07.2021 r.

Prof. dr hab. Krzysztof Maksymiuk

**Przewodniczący Komisji ds. przewodu
doktorskiego Pani mgr Moniki Mierzwy**

Ze względu na wysoką ocenę wartości naukowej rozprawy, zgłaszam wniosek o uznanie pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Mierzwy pt. „Lipidowe ciekłokrystaliczne materiały hybrydowe w formie fazy kubicznej lub magnetokubosomów jako nośniki leku” za wyróżniającą.

W uzasadnieniu wniosku chcę podkreślić bardzo wysoki poziom badań przeprowadzonych przez Panią mgr Mierzwę. Imponująca jest ilość wyników opisanych w pracy doktorskiej, świadcząca o bardzo dużym nakładzie czasu i pracy Autorki. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w 3 publikacjach, przy czym w dwóch z nich Pani mgr Mierzwa jest pierwszym autorem. Doktorantka prezentowała również wyniki swoich badań na 9 konferencjach naukowych, w tym 4 zagranicznych.

Z poważaniem

Katarzyna Krukiewicz