



Dr hab. Beata Podkościelna prof. UMCS
Instytut Nauk Chemicznych
Wydział Chemii, Katedra Chemii Polimerów
ul. Gliniana 33, 20-614 Lublin
tel: +48 81 524 22 51 w. 131
email: beata.podkoscielna@mail.umcs.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Bigaj-Józefowskiej

pt.

„Application of cancer cell membrane-coated nanoparticles in advanced liver cancer treatment”

Podstawa: uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM oraz pismo Dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu prof. dr hab. Macieja Kubickiego z dnia 3 października 2023 roku.

Podstawa prawna: art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytułach naukowych oraz stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami).

Cel i zakres pracy

Rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Bigaj-Józefowskiej wykonana została w Centrum NanoBioMedycznym Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu pod opieką naukową prof. UAM dr hab. Radostawa Mrówczyńskiego (promotor) oraz dr inż. Bartosza Grześkowiaka (promotor pomocniczy). Głównym celem naukowym przedstawionej do recenzji dysertacji była synteza bazującego na nanocząstkach systemu terapeutycznego do zastosowania w terapii nowotworowej. Zaproponowany system oparty jest na mezoporowatych, modyfikowanych żelazem nanocząstkach polidopaminy, z zaadsorbowanym lekiem chemioterapeutycznym – doksorubicyną.



Choroby nowotworowe należą do jednych z głównych przyczyn zachorowań i zgonów ludzi na świecie. Każdego roku odnotowuje się miliony nowych przypadków tej groźnej choroby, pomimo ogromnego postępu medycyny w tym temacie. Standardowe metody leczenia nowotworów są często mało skuteczne ze względu na brak specyficzności konwencjonalnych chemioterapeutyków w stosunku do konkretnych komórek nowotworowych i szybki rozwój lekooporności. Brak specyficznych leków przyczynia się do niszczenia nie tylko komórek nowotworowych, ale również powoduje cytotoksyczność w stosunku do prawidłowych komórek. Jest to duży problem medyczny i stanowi wyzwanie dla naukowców nad badaniami w temacie tzw. terapii celowanej. Do użytecznych sposobów, które mogą pomóc w poprawie przeciwnowotworowego działania leków, jest opracowanie nośników które umożliwiłyby dostarczenie leku w odpowiednim stężeniu tylko do chorobowo zmienionych miejsc. Do takich materiałów możemy zaliczyć m.in. nanocząsteczki polimerowe, liposomy, micelle polimeryczne, dendrymery oraz nanorurki. Dlatego też uważam, iż tematyka rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Bigaj-Józefowskiej dotyczy bardzo ważnego społecznie a zarazem ambitnego zagadnienia naukowego.

Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Bigaj-Józefowskiej została napisana w języku angielskim i przygotowana w układzie typowym dla prac eksperymentalnych, obejmującym: *Przegląd literaturowy* (21 stron); *Cel pracy* (2 strony); *Materiały i Metody* (27 stron); *Wyniki badań z dyskusją* (86 stron); *Podsumowanie* (2 strony) oraz *Bibliografię* (220 pozycji, 16 stron). Dodatkowo Autorka zamieściła listę skrótów używanych w dysertacji, spis tabel, rysunków oraz własny dorobek naukowy. Całość dysertacji obejmuje 178 stron maszynopisu i zawiera 33 tabele oraz 46 rysunków. Tytuł rozprawy został sformułowany poprawnie i odpowiada zaprezentowanym w ramach pracy rezultatom badań. Praca napisana jest dosyć starannie (nie licząc 2 pustych stron na wstępie pracy).

Dysertację mgr inż. Magdaleny Bigaj-Józefowskiej rozpoczyna wprowadzenie w zagadnienia nanotechnologii. Autorka opisuje aktualne możliwości jej stosowania w różnych dziedzinach. Wskazuje na potencjalne kierunki rozwoju nanotechnologii. Następnie prezentuje klasyfikację i zastosowanie nanomateriałów oraz podkreśla w jaki sposób zmniejszenie rozmiarów cząstek do skali nano- może wpływać na reaktywność



chemiczną, a także właściwości elektryczne, termiczne, optyczne i magnetyczne. Kolejny omawiany temat dotyczy klasyfikacji nanomateriałów które mogą występować w różnych formach i kształtach. Zwyczajowo dzieli się je na trzy klasy: nieorganiczne, węglowe i organiczne. Następnie, Autorka krótko charakteryzuje wszystkie wspomniane klasy, najszerszej opisując nanocząstki polimerowe. Należą one do najbardziej znanych przykładów nanocząstek organicznych. Z uwagi na właściwości materiałów polimerowych oraz ich wszechstronność, znajdują one szerokie zastosowania w medycynie i farmacji. Syntetyczne lub naturalne polimery mogą być wykorzystywane do wytwarzania nanostruktur do zastosowań biomedycznych. Polimery stosowane w medycynie powinny charakteryzować się biokompatybilnością, biodegradowalnością, minimalną lub brakiem toksyczności. Dodatkowo, powinny mieć wysoką zdolność ładowania leków i zapewniać ochronę przed degradacją leku. Preferowane są biodegradowalne i bioabsorbowalne matryce polimerowe, ponieważ mogą one ulegać degradacji w organizmie w wyniku hydrolizy lub dzięki reakcjom enzymatycznym m.in. eliminując potrzebę chirurgicznego usunięcia po implantacji. Do takich polimerów zaliczamy m.in. poli(kaprolakton), pochodne glikolu polietylenowego (PEG) czy polidopaminę.

Następnie, Autorka omawia wybrane techniki syntezy nanocząstek polimerowych. Kolejna sekcja szczegółowo opisana w pracy dotyczy polidopaminy (PDA). Polidopamina jest syntetyczną formą melaniny - naturalnie występującego pigmentu obecnego w organizmach żywych. Jedną z jej cech jest adhezyjny charakter, związany z obfitością ugrupowań katecholowych wspomaganych przez grupy aminowe, co pozwala na tworzenie konformalnych powłok na różnych podłożach, w tym metalach, ceramice i tworzywach sztucznych. Dzięki tej właściwości możliwe jest jej zastosowanie jako modyfikatora powierzchni w implantach biomedycznych, w rusztowaniach inżynierii tkankowej czy biosensorach. Oprócz właściwości adhezyjnych PDA wykazuje wyjątkową biokompatybilność, biodegradowalność i stabilność w warunkach fizjologicznych, dzięki czemu dobrze nadaje się do zastosowań biomedycznych.

Następnie, Autorka przedstawia syntezę polidopaminy oraz jej zastosowanie w terapiach przeciwnowotworowych. Tę część rozprawy kończy opis sposobów dostarczania nanocząstek do komórek nowotworowych i technologia powlekania błony komórkowej.



Analizując tę część pracy mogę stwierdzić, iż została poprawnie zaplanowana i zaprezentowana. Wprowadza czytelnika w zakres realizowanej tematyki badawczej a także potwierdza, że Autorka dokonała odpowiedniego przeglądu literaturowego.

W drugiej części dysertacji mgr inż. Magdalena Bigaj-Józefowska przedstawia *Cel pracy*. Głównymi zamierzeniami, które sobie postawiła było zaprojektowanie i synteza biomimetycznego systemu dostarczania leku pokrytego membraną, do precyzyjnego celowania w komórki nowotworowe, przy jednoczesnym obrazowaniu w czasie rzeczywistym. Polidopamina miała stanowić rdzeń dla nanonośników, z uwagi na jej ponadprzeciętne właściwości fizyko-chemiczna oraz niezwykłą zdolność do immobilizowania leków.

Badania podzielono na etapy:

- Opracowanie metody syntezy porowatych nanocząstek PDA modyfikowanych Fe o pożądanych właściwościach, w tym o kontrolowanym rozmiarze i właściwościach paramagnetycznych.
- Zbadanie procesu powlekania nanocząstek PDAFe membranami wykstrahowanymi z komórek nowotworowych HepG2, zapewniając udaną integrację i stabilność biomimetycznych nanocząstek.
- Opracowanie systemu dostarczania leków poprzez nanocząstki przy użyciu dokсорubicyny (DOX) i scharakteryzowanie profili uwalniania leku w różnych warunkach biologicznych w celu optymalizacji skuteczności terapeutycznej.
- Przeprowadzenie kompleksowych badań *in vitro* w celu oceny komórkowej internalizacji, cytotoksyczności i skuteczności terapeutycznej pokrytych błoną w porównaniu z niepowlekanymi nanocząstkami.
- Ocena potencjału połączonej terapii fototermicznej i chemioterapii poprzez wykorzystanie właściwości fototermicznych nanocząstek i ocena ich skuteczności w zwalczaniu komórek raka wątroby.
- Badanie przydatności nanocząstek do obrazowania metodą rezonansu magnetycznego.
- Przeprowadzenie szczegółowej analizy właściwości fizyko-chemicznych i analiz biologicznych w celu scharakteryzowania nanocząstek, oceny ich stabilności i uzyskania wgląd w ich interakcje z systemami biologicznymi.



- Ocena potencjału opracowanego systemu dostarczania leku w kierunku leczenia i obrazowania raka wątroby.

Kolejną, trzecią część dysertacji stanowią materiały czyli odczynniki użyte do syntezy, i tutaj moja pierwsza uwaga, zwyczajowo odczynniki przedstawia się w formie listy (jeden pod drugim), Autorka w pracy zachowała styl z artykułów naukowych czyli wszystkie odczynniki przedstawione są w sposób ciągły jak tekst, jest to trochę nietypowe rozwiązanie. W kolejnej części pracy Autorka przedstawia w rozdziale zatytułowanym „Metody” syntezę porowatych nanocząstek PDAME, procedurę immobilizacji i uwalniania leku, izolacji błon komórkowych, powlekania nanocząstek błonami komórkowymi, fizykochemiczną charakterystykę nanocząstek oraz bardzo bogatą biologiczną charakterystykę nanocząsteczek. Na str. 38 Autorka podaje, że otrzymane nanocząstki były przechowywane w etanolu w niskiej temperaturze, proszę podać z jakiego powodu stosowano tą niską temperaturę?

Rozdział czwarty prezentuje uzyskane wyniki badań oraz ich dyskusję. Na stronie 65 Autorka omawia syntezę i charakterystykę porowatych nanocząstek PDA, prezentuje także na Rys. 8, ogólny schemat poszczególnych badań, jest on bardzo interesujący i pomocny, ale brakuje mi tutaj (jako chemikowi) zaproponowania fragmentu struktury z uwzględnieniem oddziaływań/wiązań chemicznych dla otrzymanych nanocząstek PDA i ich późniejszych modyfikacji. Czy struktura otrzymanych materiałów potwierdzana była przy użyciu metod spektroskopowych? W Tabeli 11 (str. 74) przedstawiono stosunki masowe MPDA:Fe, stosunki 1:1 i 1:0.5 występują dwa razy przy czym mają inne wartości z czego to wynika?

Następnie zaprezentowane są badania uwalniania leku z nanocząstek w różnych roztworach buforowych wraz z kinetyką tego uwalniania, symulujących różne warunki biologiczne. Autorka podsumowuje, że uwalnianie leku z MPDAFe@DOX NPs następuje dzięki zjawisku dyfuzji, co potwierdza kontrolowane i długotrwałe jego uwalnianie. Kolejny podrozdział poświęcony jest omówieniu wyników badań i celowości powlekania nanocząstek błonami komórkowymi. Autorka podkreśla, że naturalna membrana może zaferować syntetycznym materiałom wiele korzyści a dodatkowo proces ten jest względnie prosty w wykonaniu. W szerokim wachlarzu różnych badań znalazła się również ocena właściwości fototermicznych, magnetycznych czy relaksacyjnych.

Kolejny etap badań obejmował wszechstronne badania biologiczne *in vitro* oraz *in vivo*. Otrzymany materiał został dokładnie przebadany pod kątem jego cytotoksyczności



przy użyciu dwóch testów: Live/Dead i testu EdU, które generalnie wykazywały znikomą cytotoksyczność w stosunku do komórek MRC5. Ciekawym zagadnieniem które zostało opisane w dysertacji to aspekt chemoterapeutyczny na przykładzie DOX-zaadsorbowanego MPDAFe@Mem NPs. Autorka podkreśla, że nanocząstki pokryte błoną wykazywały zwiększoną cytotoksyczność w porównaniu do wolnej dokсорubicyny, co tłumaczy prawdopodobnie lepszym ukierunkowaniem leku (celowanie w komórki nowotworowe) i przedłużonemu uwalnianiu leku.

W pracy przedstawione są również wstępne badania *In vivo* wykonane na Poznańskim Uniwersytecie Medycznym.

Jestem pod ogromnym wrażeniem zastosowanych metod użytych do potwierdzenia i oceny zarówno cytotoksyczności otrzymanego materiału jak i jego potencjalnych możliwości terapeutycznych. Otrzymany materiał został kompleksowo przebadany i ma duży potencjał aplikacyjny. Jakie są szanse na dalsze badania kliniczne?

Podsumowanie swoich badań Autorka zawarła w ostatnim Rozdziale 5. I tutaj czuję duży niedosyt po lekturze tej części pracy. Tak ogromny materiał badawczy został niezwykle skromnie przedstawiony w pięciu krótkich punktach, moim zdaniem to zdecydowanie za mało.

Wszystkie przedstawione w pracy uwagi lub zapytania są tylko polem do dyskusji akademickiej i nie wpływają na moją bardzo pozytywną i wysoką ocenę przedstawionej do recenzji dysertacji. Autorka otrzymała bardzo ciekawy materiał i potwierdziła jego właściwości. Wszystkie założone cele badawcze zostały zrealizowane. Autorka udowadnia, że podjęty przez nią problem badawczy jest bardzo aktualny, zawiera elementy nowości naukowej i dodatkowo ma duży potencjał aplikacyjny. Podsumowując powyższe argumenty uważam, że praca zdecydowanie zasługuje na wyróżnienie, niemniej jednak nie spełnia ona we wszystkich punktach procedury przyznawania wyróżnień na WCH UAM co z żalem stwierdzam.

Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę powyższe fakty stwierdzam jednoznacznie, że przygotowana przez Panią **mgr inż. Magdalenę Bigaj-Józefowską** rozprawa doktorska pt.



„Application of cancer cell membrane-coated nanoparticles in advanced liver cancer treatment”

spełnia wszystkie kryteria stawiane pracom doktorskim, ujęte w art. 13 pkt. 1 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 i ust. 2 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.), dlatego też kieruję do *Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu* wniosek o **dopuszczenie Autorki do kolejnych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.**

Lublin, 07.11.2023

Podpis: Beata



