

## OCENA ROZRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Magdaleny Bigaj-Józefowskiej

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

wykonanej

w Centrum NanoBioMedycznym Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu

pod kierunkiem dr. hab. Radosława Mrówczyńskiego, prof. UAM oraz dr. inż. Bartosza Grześkowiaka (promotor pomocniczy)

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM.

### 1. Charakterystyka formalna rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Magdaleny Bigaj-Józefowskiej pt. „*Application of cancer cell membrane-coated nanoparticles in advanced liver cancer treatment*” została przygotowana w języku angielskim i oparta jest na klasycznym opisie obejmującym omówienie wyników.

Praca została opatrzona streszczeniem zarówno w języku angielskim, jak i polskim, jak również dołączono do niej opis aktywności naukowej Doktorantki, obejmujący udział w konferencjach oraz listę publikacji, których Doktorantka jest autorką i współautorką. Rozprawa doktorska zbudowana została w typowy sposób i zawiera rozdziały takie jak: Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki z dyskusją, Podsumowanie, Spis Bibliografii, oraz Indeks Rycin i Tabel.

Wstęp pracy zawiera przegląd literaturowy obejmujący omówienie zagadnień związanych z nanotechnologią, w którym Doktorantka opisuje typy najczęściej stosowanych nanomateriałów, sposoby ich otrzymywania, ich wady oraz zalety, jak również możliwości wykorzystania.

W rozdziale tym znajduje się także opis systemów nanocząstkowych znajdujących potencjalne zastosowanie w terapii nowotworów oraz wnikliwe omówienie- głównego typu nanocząstek stosowanych w pracy- cząstek opartych na polidopaminie (PDA). Doktorantka porusza w tym rozdziale kwestie związane z takimi cechami nanocząstek jak ich właściwości magnetyczne, fizykochemiczne oraz biologiczne. Wprowadza również czytelnika w kwestie związane z metodami otrzymywania cząstek PDA oraz możliwości ich funkcjonalizowania, a w końcu- ich zastosowania w aplikacjach biomedycznych.

Uważam, że ta część pracy została przygotowana przez mgr Magdalenę Bigaj-Józefowską bardzo starannie z wykorzystaniem właściwych źródeł literaturowych. Rozdział ten nie jest przesadnie długi, jednak, moim zdaniem, w pełni wyczerpuje zakres tematyczny związany z rozprawą doktorską. Został napisany czytelnym językiem, który doskonale wprowadza czytelnika w prezentowane prace oraz opatrzone dobrymi rycinami.

## 2. Przedmiot i cele rozprawy oraz zastosowana metodyka badawcza

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Magdaleny Bigaj-Józefowskiej dotyczy spójnego tematycznie zagadnienia obejmującego badania potencjału rozwiązań z zakresu syntezy nanocząstek w zastosowaniach biomedycznych. Doktorantka skupiła się w pracy na wykorzystaniu nanocząstek PDA opłaszczonych błonami komórkowymi w potencjalnej terapii raka wątroby.

Głównym celem przedłożonej do recenzji pracy było opracowanie nanocząstek magnetycznych MPDAFe, które po pokryciu ich błonami komórkowymi miałyby służyć do efektywnego i specyficznego dostarczenia leków do miejsca docelowego. Jednocześnie miałyby umożliwiać zastosowanie łączonej chmio- i fototerapii, a także umożliwić obrazowanie w rezonansie magnetycznym (MRI). Cel pracy Doktorantka zrealizowała w następujących etapach:

1. opracowanie jednoetapowej syntezy nanocząstek skutkującej powstaniem mezoporowatych, modyfikowanych żelazem (MPDAFe) cząstek;
2. funkcjonalizacja nanocząstek poprzez załadowanie ich standardowym lekiem chemioterapeutycznym- doksorubicyną (DOX);
3. modyfikacja powierzchni nanocząstek poprzez ich opłaszczenie błoną komórkową uzyskaną z komórek nowotworowych linii HepG2 celu uzyskania biomimetycznego systemu skutecznego dostarczania leków do wątroby;
3. badanie aktywności nanocząstek w układach teranostycznych w warunkach *in vitro* oraz wstępne badanie w układzie *in vivo*.

Celem pierwszej części pracy było opracowanie efektywnej syntezy oraz poznanie właściwości fizykochemicznych oraz magnetycznych nanocząstek. Pierwszy etap obejmował załadowanie nanocząstek doksorubicyną, a następnie badanie kinetyki uwalniania leku. Ostatnim etapem przygotowanie specyficznych nanokompleksów zawierających nanocząstki oraz leki cytostatyczne, było opłaszczenie nanocząstek błonami komórkowymi pochodzącymi z linii komórkowej raka wątroby HepG2. W następnych krokach przeprowadzono badanie właściwości fototermicznych, magnetycznych oraz kontrastujące badanych układów.

Druga część pracy poświęcona została badaniom właściwości biologicznych badanych nanocząstek w układach linii komórkowych *in vitro* oraz *in vivo* z wykorzystaniem myszy szczepionych podskórnie komórkami raka wątroby. W tej części pracy przeprowadzono badania cytotoksyczności, w tym możliwości wywoływania przez badane układy stresu oksydacyjnego, internalizacji z komórkami, efektywności dostarczania doksorubicyny selektywności dostarczania leku do komórek przeznaczenia po opłaszczeniu błoną komórkową. Przeprowadzono także pilotowe badanie aktywności biologicznej nanocząstek w mysim układzie modelowym.

Podsumowując, aby zrealizować założone cele badawcze, Doktorantka zastosowała szereg technik- chemicznych, biologicznych oraz biofizycznych, które moim zdaniem były odpowiednie do ich realizacji. Zostały one opisane w odpowiednim rozdziale „Materials and Methods”.

### 3. Najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy

Rozprawa przedstawia rezultaty wielu właściwie zaplanowanych prac. Najistotniejsze, moim zdaniem, wyniki uzyskane w wyniku realizacji pracy to:

1. opracowanie i optymalizacja syntezy oraz funkcjonalizacja nanocząstek typu MPDAFe;
2. określenie właściwości biologicznych opracowanych nanokompozytów – duża biokompatybilność oraz niskie właściwości cytotoksyczne;
3. uzyskanie nanokompleksów teranostycznych stworzonych do efektywnego i specyficznego dostarczania chemioterapeutyków w leczeniu raka wątroby;
4. wykazanie, iż badane nanocząstki mogą być wykorzystane przy obrazowaniu MRI do precyzyjnego diagnozowania raka wątroby i monitorowania terapii w czasie rzeczywistym.

### 4. Znaczenie uzyskanych wyników

Literatura naukowa obejmuje w tej chwili wiele prac wskazujących na potencjalne zastosowanie nanotechnologii. Szczegółowe mechanizmy działania wielu nanokompozytów pozostają wciąż jednak nieznanne, podobnie jak ciągle brakuje doniesień pokazujących szerokie wykorzystanie rozwiązań nanotechnologicznych w medycynie. Praca mgr Magdaleny Bigaj-Józefowskiej łączy w sobie zarówno elementy badań podstawowych, jak i próbę wykorzystania nanotechnologii w badaniach aplikacyjnych. Przedstawione prace i ich wyniki mogą otworzyć nowe perspektywy w diagnozowaniu, leczeniu i monitorowaniu leczenia nowotworów, poprzez łączenie ukierunkowanego dostarczania leków, terapię fototermiczną oraz chemioterapię z obrazowaniem MRI. Stanowi to bardzo dobry punkt wyjścia do kontynuowania prac w kierunku szerokiego, praktycznego zastosowania biomimetycznych nanokompozytów opartych o polidopaminę w zaawansowanych terapiach przeciwnowotworowych.

### 5. Komentarze i pytania

1. Charakterystyka nanocząstek i obrazy SEM pokazują duże agregaty nanocząstek. Na stronie 68 w tabeli 10 Doktorantka przedstawia wyniki badania nanocząstek pod względem ich polidispersyjności. Próbkę nr 1 wykazuje polidispersyjność bliską 1, co oznacza bardzo różną wielkość otrzymanych nanocząstek. Taki też obraz przedstawia Rys. 9. Czy Doktorantka może wyjaśnić, skąd w tych warunkach, bierze się taka duża rozpiętość rozmiaru nanocząstek?
2. Na stronie strona 76-77 – na Rys.12 E cząstki MPDAMn (L) w obrazie TEM sprawiają wrażenie silnej agregacji składającej się z cząstek bardzo różnej wielkości. Pomiary DLS wskazują jednak na wartości PDI 0.11. Czy Doktorantka może wyjaśnić, dlaczego te wyniki sobie nie odpowiadają?
3. Na stronie 139- . Rys. 42. badanie wpływu nanocząstek załadowanych doksorubicyną wykazuje zwiększenie ilości ROS. Czy Doktorantka może wyjaśnić, dlaczego nanocząstki pozbawione chemioterapeutyku wpływają na obniżenie tego poziomu?
4. Czy przy pomiarach w testach WST-1 w końcowym etapie eksperymentu zmierzona została absorpcja samego roztworu? Czy nanocząstki, przez wzgląd na swoją budowę chemiczną, nie zaburzały tego pomiaru?

5. Bardzo podoba mi się idea opłaszczania nanocząstek błonami komórkowymi odpowiadającymi miejscu ich przeznaczenia. Do tego fragmentu pracy mam kilka pytań:

- a. Które ze składników błony, są kluczowe dla efektywnego transportu nanocząstek do miejsca przeznaczenia?
- b. Czy proces pozyskiwania błony poprzez ekstruzję może wpływać na fragmentację błony oraz na zmianę jej składu?
- c. Czy proces pozyskiwania błon w warunkach laboratoryjnych, może być, wg Doktorantki, procesem skalowalnym i mógłby być wykorzystywany w skali produkcyjnej?
- d. Na stronie 96- Rys. 22. przedstawiono badanie profilu ekstraktów białkowych frakcji błonowej oraz frakcji cytoplazmatycznej. Na rysunku A pokazano żel SDS dla frakcji błonowej, pęcherzyków błonowych oraz nanocząstek opłaszczonych błoną. Na rysunku B znajduje się wynik analizy typu Western blot dla specyficznych białek błonowych. Przedstawione wyniki rzeczywiście potwierdzają czystość izolacji frakcji błonowej, ale brakuje mi tutaj analizy obecności białek błonowych w próbce zawierającej nanocząstki z błoną. Z czego wynika brak takiej próby?
- e. Na stronie 142- Rys. 43 przedstawiono wyniki badania specyficzności nanocząstek opłaszczonych błoną w linii komórek raka wątroby oraz glejaka. Istotne różnice w przeżywalności komórek obserwowano dla cząstek magnetycznych opłaszczonych błoną oraz załadowanych doksorubicyną. Pomimo różnic w przeżywalności komórek raka wątroby i glejaka- komórki wątroby wydają się być bardziej wrażliwe na działanie nanokompleksów, to jednak komórki glejaka wykazywały również znacząco obniżoną żywotność. Jeśli porównać działanie nanocząstek opłaszczonych błoną komórkową oraz cząstek nieopłaszczonych, to w przypadku linii raka wątroby efekt cytotoksyczny jest zauważalny i wydaje się być specyficzny. Jak wyjaśnić efekt działania tych nanocząstek na przeżywalność komórek glejaka, gdzie nanocząstki opłaszczone błoną komórek wątroby również wywołują silniejszy efekt cytotoksyczny?
- f. Czy podjęto próbę weryfikację specyficzności działania nanocząstek w linii komórek prawidłowych?
- g. Na stronie 143, w tabeli 32 przedstawiono dane statystyczne dla analiz porównawczych nanocząstek MPDAFe oraz PDAFe. Czy mogę prosić o wyjaśnienie, do której analizy (wykresu) odnoszą się te dane?

6. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki, zostały opisane bardzo starannie. Jednak, ze zdziwieniem stwierdzam, że w pracy brakuje konkretnych porównawczych danych liczbowych. Wszystkie wykresy podsumowane są tabelami z odpowiadającymi im danymi statystycznymi (np. p – value, czy istotność statystyczna), brakuje jednak prostych informacji o tym jak zmieniają się wartości w wyniku stosowania nanocząstek określonego typu. Spodziewałabym się zobaczyć opis wskazujący na np. „20% obniżenie żywotności komórek przy zastosowaniu MPDAFe@DOX”. To znacząco ułatwiłoby właściwą interpretację wyników.

## 6. Podsumowanie

W ocenianej rozprawie doktorskiej mgr Magdaleny Bugaj-Józefowskiej na uwagę zasługuje połączenie prac z zakresu badań podstawowych z badaniami potencjalnie aplikacyjnymi. Bardzo podoba mi się zastosowanie połączenia metod chemicznych, biologicznych oraz biofizycznych do możliwie najbardziej rzetelnego badania właściwości stosowanych nanocząstek. Uważam, iż rozprawa doktorska stanowi bardzo dobrą podstawę do

kontynuowania i poszerzenia badań w tej tematyce. Szczególnie cenne wydaje mi się tutaj rozwijanie wątku tworzenia kompleksów teranostycznych, które mogłyby w znaczący sposób wpłynąć na poprawę wyników leczenia raka wątroby. Szczególnie ważne jest tutaj z pewnością podejście zmierzające do stworzenia cząstek wielofunkcyjnych do jednoczesnej chemio-, foto- i radioterapii.

## **7. Wniosek końcowy**

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Magdaleny Bigaj-Józefowskiej spełnia wszystkie warunki stawiane kandydatom w Ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742). Zwracam się zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Bigaj-Józefowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 20.12.23

dr hab. Katarzyna Rolle, prof. ICHB PAN