

dr hab. Marcin Wierzchowski

Poznań, 25.02.2023

Katedra i Zakład Technologii Chemicznej

Środków Leczniczych

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego

W Poznaniu

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Żebrowskiej

pt.: „**Multifunctional nanocarriers based on polydopamine for biomedical applications**”

Recenzowana praca doktorska Pani magister Klaudii Żebrowska została wykonana w Centrum Nanobiomedycznym Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Promotorem pracy jest dr hab. Emerson Coy, prof. UAM z Centrum Nanobiomedycznego Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, a promotorem pomocniczym dr inż. Bartosz F. Grześkowiak z Centrum Nanobiomedycznego Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Od końca lat 50 XX wieku, kiedy Richard P. Feynman uważany za ojca nanotechnologii wygłosił wykład „There's Plenty of Room at the Bottom” obserwujemy dynamiczny wzrost zainteresowania tą fascynującą dziedziną nauki, w której prawa rządzące mikro- i makroświatem wzajemnie się przenikają. Nanotechnologia znalazła zastosowanie w wielu dziedzinach życia począwszy od nowoczesnych środków piorących, powłok ochronnych i nanokompozytów stosowanych w przemyśle samochodowym, katalizatorów stosowanych w przemyśle chemicznym. Nanozwiązki tlenku tytanu stosowane są w ochronie środowiska. Substancje o rozmiarach „nano” znalazły zastosowanie w produkcji najnowocześniejszych rozwiązań z dziedziny optyki i elektroniki. Na szczególną uwagę zasługują zastosowania nanotechnologii w medycynie i farmacji. Rozwój w przypadku tych dwóch spokrewnionych dziedzin przebiega na kilku polach i dotyczy samego projektowania nowych substancji leczniczych, selektywnych markerów stosowanych w diagnostyce, opracowywaniu nowych substancji pomocniczych jak nowoczesne nośniki leków odpowiedzialne za transport leku do miejsca docelowego działania. Postęp jest obserwowany również w dziedzinie urządzeń diagnostycznych czy wyrobów medycznych takich jak inteligentne implanty zdolne do monitorowania stanu pacjenta czy opatrunki z substancją leczniczą w formie nanomateriału.

Pomimo wielu spektakularnych sukcesów w dziedzinie medycyny obserwujemy jednak

wiele problemów, które nie znalazły optymalnego rozwiązania lub narastają w związku ze zmianą stylu życia, starzeniem się społeczeństw, zanieczyszczeniem środowiska naturalnego lub rosnącymi kosztami terapii. Takim, wielkim wyzwaniem pozostaje terapia nowotworów. Poszukuje się nowych rozwiązań zwalczania nowotworów jak fototerapia czy terapia genowa. Stosuje się wspomaganie klasycznej chemioterapii przez stosowanie nowoczesnych transporterów leków w celu obniżenia dawki i ograniczenia działań niepożądanych jak również nowoczesne metody wizualizacji zmian chorobowych wspomagające leczenie chirurgiczne. Zastosowanie nanotechnologii i na przykład terapii fotodynamicznej daje szansę na uzyskanie rozwiązań teranostycznych – łączących w jednym systemie terapeutycznym zdolności do leczenia i diagnozowania zmian nowotworowych. Takie systemowe podejście jest szczególnie korzystnie przez obniżenie kosztów terapii i podniesienie jej bezpieczeństwa.

Badania wykonane w ramach pracy doktorskiej pani Klaudii Żebrowskiej wpisują się w wyżej opisany, ogólnoswiatowy trend poszukiwania nowych systemów terapeutycznych łączących w więcej niż jeden mechanizm działania terapeutycznego z nowoczesnym nośnikiem leku.

Praca doktorska jest napisana w języku angielskim co znacząco zwiększa dostępność zawartych w niej treści i w przyszłości ułatwi jej opublikowanie. W skład dysertacji wchodzi następujące główne rozdziały jak: „Introduction”, „Objectives and Aims”, „Materials and Methods”, „Results and Discussion”, „Conclusions”, „Bibliography”, „List of Figures” i „List of Tables”. Recenzowana praca liczy łącznie 144 strony. W pierwszym rozdziale pracy „Introduction”, Autorka przedstawia stan wiedzy dotyczący jej głównych obszarów badawczych jakimi są nanotechnologia jej definicja i podział, nanomedycyna z uwzględnieniem podziału na różne typy nanonośników jak: polimeryczne - dendrymery, nieorganiczne - kropki kwantowe i oparte na warstwach lipidowych - liposomy. Przedstawia również zastosowanie nanoformulacji opartych na nanocząstkach otrzymanych z polidopaminy (PDA). Przedstawia również postawy dotyczące innych dziedzin, które będą wykorzystywane w eksperymentalnej części pracy jak podstawy chemioterapii z zastosowaniem doksorubicyny (DOXO) i kurkuminy (CUR). Przedstawiono podstawy stosowanej później terapii genowej z wykorzystaniem dwuniciowego RNA o sekwencji homologicznej do mRNA Tenescyny C, co zostało wykorzystane do wyciszenia nadekspresji tego białka w przypadku rozwoju różnych typów nowotworu. Dodatkowo Autorka przedstawia w tym rozdziale alternatywną dla klasycznej chemioterapii technikę jaką jest fototerapia ze szczególnym naciskiem na stosowaną dalej terapię fototermiczną PTT.



Rozdział drugi pt.: „Objective s and Aims” to przedstawienie głównych celów badawczych, którym była synteza i charakterystyka nowego typu nanocząstek na bazie polidopaminy jako potencjalnego inteligentnego nośnika leków do łącznego dostarczania środków leczniczych i chemoterapii, genoterapii i terapii fototermicznej wobec wybranych komórek nowotworowych.

Rozdział „Materials and Methods” przedstawia opis eksperymentów chemicznych, fizycznych i biologicznych metod stosowanych w realizacji zaplanowanych badań. Interdyscyplinarny charakter pracy Pani magister Klaudii Żebrowskiej podkreśla imponujący zakres prowadzonych eksperymentów i zastosowanych metod badawczych. Eksperymentom syntetycznym związanym z optymalizacją syntezy i stabilności otrzymanych nanocząstek prostych jak i układów core-shell, towarzyszą zaawansowane techniki spektroskopowe jak spektroskopia UV-vis i FTIR, wysokorozdzielcza transmisyjna mikroskopia elektronowa HR TEM i mikroskopia konfokalna, pomiary potencjału ζ nanocząstek oraz właściwości magnetycznych otrzymanych nanocząstek sfunkcjonalizowanych atomami żelaza. W skład badań biologicznych wchodziły testy cytotoksyczności WST-1 i MTT, testy przeżywalności komórek w wykorzystaniem cytometrii przepływowej, badania indukowania stresu oksydacyjnego oraz badanie stopnia indukowania apoptozy w przypadku badanych linii komórkowych: ludzkiej linii nowotworu wątroby HepG2, linii ludzkich komórek glejaka mózgu U118 oraz ludzkiej linii fibroblastów MRC-5.

Analizując odciągnięcia opisane rozdziale „Results and Discussion” i podsumowane w rozdziale „Conclusions” można wyciągnąć wniosek, że Autorka zrealizowała wszystkie cele postawione z rozdziale „Objectives and Aims”. Autorka zoptymalizowała warunki syntezy nanocząstek PDA i PDA@CUR z inkorporowaną kurkumina tak aby otrzymać ich planowany rozmiar oraz potwierdzić brak toksyczności na linii MRC-5. Nanocząstki PDA przekształcono w układy rdzeń-otoczka przez pokrycie kryształami hydroksytlenku żelaza(III) w formie β -FeOOH. Tak otrzymane PDA@ β -FeOOH charakteryzowały się silnymi właściwościami fototermicznymi i superparamagnetycznymi. Inne nanocząstki otrzymano przez otoczkowane dendrymerami PAMAM zarówno posiadające rdzeń z PDA i PDA@CUR. Tak otrzymane PDA@DD jak i PDA@CUR@DD są nietoksyczne wobec badanych linii komórkowych natomiast nadają się do zastosowania w terapii fototermicznej. Obserwowano znaczący wzrost temperatury badanego układu zawierającego nanocząstki przy naświetlaniu laserem o długości fali 808 nm.



W przypadku nanocząstek kurkuminowych i niekurkuminowych otoczonych dendrymerami wykazano, że spełniają one swoją rolę jako transportery doksorubicyny. Obrazowanie konfokalne wykazało obecność tego leku w obrębie jąder komórkowych linii U118. W badaniach symulowano zastosowanie terapii kombinowanej z jednocześnie mechanizmu fotocytotoksycznego związanego z naświetlaniem i cytotoksycznego związanego z uwalnianiem doksorubicyny. Testy nanocząstek PDA@CUR@DD@DOXO wykazały, że zastosowanie takiego podejścia powoduje przejście wszystkich komórek linii U118 do późnej fazy apoptozy już w stężeniu 2,5 µg/ml podczas gdy komórki linii HepG2 są martwe lub w późnej fazie apoptozy dla stężenia 10,0 µg/ml

Przydatność otrzymanych nanocząstek potwierdzono również w testach związanych z terapią genową. Do nanocząstek PDA z otoczką dendrymerową i inkorporowaną doksorubicyną PDA@DD@DOXO przyłączono na powierzchni dendrymerów dwuniciowe RNA. Testy z zastosowaniem qRT-PCR wykazały spadek ekspresji mRNA tenascyny C co potwierdza przydatność tych nanocząstek jako wektorów nici RNA. Tak otrzymane nanocząstki były aktywniejsze od badanych wyjściowych układów w testach cytotoksyczności. Ostatecznie sprawdzono, czy są one skuteczne w połączeniu foto-, chemio- i genoterapii. W badanym zakresie stężeń od 9,0 - 1,125 µg/ml w cytometrii przepływowej obserwowano apoptotyczną śmierć komórek glejaka U118 po naświetleniu światłem lasera 808 nm i mocy 3W.

Wnioski przedstawione przez Autorkę trafnie podsumowują osiągnięcia jakimi było uzyskanie wielowarstwowych, wieloskładnikowych nanocząstek o potencjalnej przydatności w terapii i diagnostyce chorób nowotworowych.

Bardzo dobrej oceny pracy dysertacji nie obniżają pewne kwestie, na które jako recenzent muszę zwrócić uwagę. Przedstawiony na stronie 35 i rycinie 8 mechanizm fototermiczny to w istocie przedstawiony na diagramie Jabłońskiego mechanizm działania fotodynamicznego.. W przypadku zaproponowanego dla nanocząstek otoczonych hydroksytlenkiem żelaza(III) typu śmierci komórki - ferroptozy nie mamy pewności, że jest to główny mechanizm śmierci komórki a jedynie, że są generowane ROS. Proponuję traktować tę kwestię jako niepotwierdzoną hipotezę badawczą. Sama Autorka stwierdza, że aby potwierdzić ten mechanizm działania potrzebne są dalsze badania.

Reasumując, uważam, iż praca mgr Klaudii Żebrowskiej jest przykładem bardzo dobrze zaplanowanej i wykonanej pracy badawczej o wysokim poziomie merytorycznym.

 4

Przedstawione w dysertacji opis badań doktorantki stanowi przykład kompleksowego podejścia, do badań, które są częścią nurtu nowoczesnych i racjonalnych metod poszukiwania nowych substancji leczniczych oraz ich nośników. Z tego powodu pracę należy uznać za bardzo wartościową.

Wyniki badań zawarte w ramach pracy doktorskiej Pani mgr Klaudii Żebrowskiej zostały już częściowo opublikowane w artykule pt.: Facile and Controllable Growth of β -FeOOH Nanostructures on Polydopamine Spheres, w czasopiśmie The Journal of Physical Chemistry B o punktacji MEiN równej 140 i współczynniku wpływu $IF=3,466$, którego jest pierwszą Autorką. Dodatkowo Pani magister jest współautorką innej pracy z dziedziny nanotechnologii „Magnetite Nanoparticles and Spheres for Dual Therapy of Hepatocellular Carcinoma in vitro, International Journal of Nanomedicine, 2020” o punktacji MEiN równej 140 i współczynniku wpływu $IF=7,033$ oraz kilkunastu ustnych i posterowych prezentacji na krajowych i międzynarodowych konferencjach.

Realizacja pracy doktorskiej z tak szerokim, multidyscyplinarnym wachlarzem badań był możliwy dzięki dofinansowaniu z projektów "Środowiskowe interdyscyplinarne studia doktoranckie w zakresie nanotechnologii" nr POWR.03.02.00-00-I032/16 w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego - Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój, Oś III Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju, Działanie 3.2 oraz Minigranty doktoranckie" 017/02/SNŚ/0019.

Rozprawa doktorska mgr mag Klaudii Żebrowskiej spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz. 574 ze zm.), w związku z czym zwracam się do Rady Naukowej Dyscyplin Nauki Fizyczne i Astronomia Wydziału Fizyki UAM w Poznaniu z wnioskiem o nadanie mgr Klaudii Żebrowskiej stopnia doktora nauk fizycznych. Wnioskuje również o jej wyróżnienie.

dr hab. n. farm Marcin Wierchowski

dr hab. n. farm.

Marcin Wierchowski

dr hab. Marcin Wierzchowski

Poznań, 25.02.2023

Katedra i Zakład Technologii Chemicznej

Środków Leczniczych

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego

W Poznaniu

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

mgr Klaudii Żebrowskiej

pt.: „ **Multifunctional nanocarriers based on polydopamine for biomedical applications**”

Wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Klaudii Żebrowskiej, która jest przykładem dobrze zaplanowanej i wykonanej pracy badawczej o wysokim poziomie merytorycznym. Przedstawione w dysertacji opis badań doktorantki stanowi przykład kompleksowego podejścia, do badań, które są częścią nurtu nowoczesnych i racjonalnych metod poszukiwania nowych substancji leczniczych oraz ich nośników. Na pochwałę zasługuje bogactwo zaawansowanych metod i narzędzi badawczych. W toku prowadzonych prac uzyskano nanocząstki o potencjalnym zastosowaniu fototerapii, chemioterapii lub genoterapii chorób nowotworowych.

dr hab. n. farm Marcin Wierzchowski

dr hab. n. farm.
Marcin Wierzchowski
Marcin Wierzchowski