

dr hab. inż. Karolina Adrjanowicz, prof. UŚ
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych
Uniwersytet Śląski w Katowicach
75 Pułku Piechoty 1a
41-500 Chorzów
email. karolina.adrjanowicz@us.edu.pl
tel. 32 359 75 70

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Żebrowskiej

„Multifunctional nanocarriers based on polydopamine for biomedical applications”

Głównym celem rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Żebrowskiej było wytworzenie i scharakteryzowanie własności nowego typu multifunkcyjnych nanocząstek bazujących na polidopaminie które mogłyby mieć zastosowanie w nanomedycynie, jako nośniki substancji leczniczych (w tym przypadku doksorubicyny) w łączonej terapii przeciwnowotworowej. Doktorantka do modyfikacji wytworzonych nanocząstek polidopaminy wykorzystuje trzy strategie: (i) funkcjonalizuje ich powierzchnię z użyciem dendrymerów poliamidoaminowych PAMAM i podłączeniu fragmentu dwuniciowego RNA (dsRNA), (2) struktur żelaza β -FeOOH, a także (3) przygotowuje struktury typu core-shell w których rdzeniem jest hydrofobowa kurkumina. Tak przygotowane nanoosięniki poddano kompleksowym badaniom fizykochemicznym i biologicznym celem oceny ich cytotoksyczności i efektywności w zwalczaniu komórek nowotworowych.

Rozpatrywane zagadnienia stanowią bardzo ciekawy i aktualny temat badawczy z zakresu nano- i biofizyki. Dostarczają wielu cennych wyników eksperymentalnych które w przyszłości mogą stanowić podstawę do szerszego wykorzystania nanomateriałów opartych na polidopaminie w nanomedycynie, ze szczególnym uwzględnieniem skojarzonych geno-/chemio- i fototerapii.

Rozprawa doktorska mgr Klaudii Żebrowskiej jest napisana w tradycyjnej formie, tj. obszernej pracy pisemnej i z tego co można wywnioskować wyniki większości zamieszczonych w niej badań nie zostały do tej pory opublikowane w postaci odrębnych artykułów naukowych. Biorąc pod uwagę nakład sił i środków koniecznych do przeprowadzenia wielu zamieszczonych w niniejszej rozprawie doktorskiej badań, zwłaszcza biologicznych, jest to dość niezrozumiałe. Doktorantka podaje wprawdzie listę dwóch opublikowanych prac, których jest współautorką (plus dodatkowo jednej pracy w przygotowaniu) jednak nie informuje czy stanowią one podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej. Lista publikacji o których mowa to:

1. Klaudia Żebrowska, Emerson Coy, Karol Synoradzki, Stefan Jurga, Pau Torruella, Radosław Mrówczyński, Facile and Controllable Growth of β -FeOOH Nanostructures on Polydopamine Spheres, J. Phys. Chem. B 2020, 124, 9456–9463
2. Artur Jędrzak, Bartosz Grześkowiak, Klaudia Golba Emerson Coy, Karol Synoradzki, Stefan Jurga, Teofil Jesionowski, Radosław Mrówczyński, Magnetite Nanoparticles and Spheres for

Chemo- and Photothermal Therapy of Hepatocellular Carcinoma in vitro, International Journal of Nanomedicine 2020:15 7923–7936

3. K. Żebrowska, M. Grabowska, E. Coy, K. Rolle, B. F. Grześkowiak, Multifunctional polydopamine nanoparticles for combined chemo-/photo-/gene therapy of glioblastoma multiform (w przygotowaniu)

W żadnej z opublikowanych do tej pory prac Doktorantka nie jest autorem korespondencyjnym, choć w jednej z nich jest pierwszym autorem. Bez oświadczeń pozostałych współautorów ciężko jest jednoznacznie ocenić Jej udział w ich powstanie. Jako recenzentowi pozostaje mi więc wyłącznie ocena merytoryczna napisanej pracy doktorskiej.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej Doktorantka podjęła się syntezy badanych przez siebie nanomateriałów na bazie polidopaminy, co z pewnością wiązało się ze sporym nakładem czasu i pracy celem optymalizacji ich parametrów. Należy także podkreślić, że Doktorantka bardzo kompleksowo podeszła do postawionych sobie celów badawczych o czym może świadczyć liczba technik eksperymentalnych które zostały wykorzystane do charakterystyki fizykochemicznej uzyskanych nanomateriałów a także testów biologicznych. Świadczy to o jej wszechstronnej wiedzy z tej tematyki i jest naprawdę bardzo imponujące.

Praca doktorska została przygotowana zgodnie z wymogami ustawowymi. Obejmuje ona: wprowadzenie do tematyki związanej z nanotechnologią i wykorzystaniem nanocząstek polidopaminy w terapii przeciwnowotworowej (rozdział 1), przedstawienie celów i założeń pracy (rozdział 2), opis materiałów i wykorzystanych metod badawczych (rozdział 3), omówienie uzyskanych wyników (rozdział 4), podsumowanie, spis literatury obejmujący 104 pozycje oraz listę rysunków i tabel. Streszczenia w języku polskim i angielskim zamieszczone są na początku pracy. Całość pracy napisana jest w języku angielskim.

Przed przystąpieniem do przedstawienia najważniejszych wyników badań przedłożonej rozprawy doktorskiej wraz z uwagami recenzenta należy zaznaczyć, że wykorzystanie polidopaminy do syntezy wielozadaniowych inteligentnych materiałów mogących mieć zastosowanie w nanomedycynie stanowi bardzo aktualny temat badawczy. Warto tutaj choćby wspomnieć o tym, iż sama polidopamina, czyli wyjątkowy, silnie adhezyjny polimer inspirowany tym co można spotkać w naturze został po raz pierwszy uzyskany dopiero w 2007 roku. Co ciekawe, sama struktura polidopaminy stanowi zagadkę i nie jest do tej pory w pełni zbadana. Polidopamina jest aktualnie przedmiotem intensywnych badań naukowych zwłaszcza w obszarze nanotechnologii i biomedycyny, głównie ze względu na jej biokompatybilność, łatwość funkcjonalizacji i własności fototermiczne. W literaturze tego tematu można znaleźć wiele prób wykorzystania polidopaminy jako multifunkcyjnych platform do transportu związków terapeutycznych, zwłaszcza cytostatyków do komórek nowotworowych, czy też wektorów przenoszących geny celem zmiany odpowiedzi biologicznej komórek. Polidopamina wykazuje absorpcję promieniowania w zakresie bliskiej podczerwieni (808 nm) i wysoką efektywność jej konwersji w ciepło - sięgającą nawet 40% - dzięki czemu stanowi ona potencjalny czynnik w terapii fototermicznej. W ten sposób nanomateriały bazujące na polidopaminie mogą być zastosowane do opracowania skojarzonych chemio, geno- i foto- terapii celem jeszcze skuteczniejszej walki z chorobami nowotworowymi.

Badania wykonane przez Doktorantkę w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej idealnie wpisują się w bieżącą tematykę badań poświęconym tego typu materiałom. Mają one

charakter badań podstawowych, a wyniki biologiczne wskazujące brak cytotoxiczności przy jednoczesnej wysokiej skuteczności w zwalczaniu komórek raka wątrobowokomórkowego HepG2 i glejaka wielopostaciowego U-118 MG w trakcie łączonej chemio i fototerapii są niezwykle obiecujące. Niestety, w podsumowaniu zabrakło informacji o perspektywach i kierunkach przyszłych badań bazujących na uzyskanych do tej pory wynikach.

W rozdziale 1 Doktorantka przedstawia krótkie wprowadzenie do tematyki nanotechnologii i jej wykorzystaniu w medycynie. Doktorantka zwraca tutaj uwagę na nowoczesne metody walki z chorobami nowotworowymi – będącymi plagą naszych czasów - poprzez zastosowanie nanomateriałów w chemioterapii, terapii genowej i fototerapii. Opisuje również własności polidopaminy, które stanowią podstawę ich wykorzystania w jako wielozadaniowych nośników w nanomedycynie. Oprócz tego w rozdziale tym można znaleźć informacje o mechanizmie działania doksorubicyny (DOXO) będącego modelowym lekiem przeciwnowotworowym transportowanym **do komórek docelowych z wykorzystaniem nanocząstek polidopaminy a także kurkuminy, która** niejako wzmacnia skuteczność działania samej DOXO.

Rozdział 2 zawiera szczegółowe informacje na temat metodyki otrzymywania nanocząstek polidopaminy, a także metodach ich funkcjonalizacji. Jak już wspomniano wcześniej Doktorantka syntezowała wszystkie badane przez siebie układy. Były to dwa rodzaje nanomateriałów: „czyste” (tzn. niczym nie powleczone) nanocząstki polidopaminy oraz nanocząstki typu core-shell, gdzie rdzeniem była hydrofobowa kurkumina a otoczkę stanowiła hydrofilna polidopamina. We wstępnym etapie uzyskiwane nanocząstki miały różne rozmiary, przy czym do dalszej funkcjonalizacji wybrane zostały tylko niektóre z nich. Nanocząstki polidopaminy były powlekanie poprzez (i) osadzanie struktur żelaza na ich powierzchni, a także (ii) dedrymerami poliamidoaminowymi trzeciej generacji, PAMAM. Dzięki drzewkowatej, rozgałęzionej strukturze PAMAM w ich wnętrzu transportowano doxorubicynę. Dalszym etapem tej modyfikacji było również podłączenie struktury dwuniciowego RNA (dsRNA) o sekwencji homologicznej do tenascyny – C (TNC) celem zahamowania ekspresji tenascyny w komórkach nowotworowych i poprawy skuteczności terapii. Przeprowadzenie wszystkich wspomnianych powyżej funkcjonalizacji stanowiło jedynie pierwszy etap badań. Kolejnym, była bowiem analiza ich własności fizykochemicznych i biologicznych. Wśród szerokiego spektrum technik eksperymentalnych wykorzystanych do analizy parametrów fizykochemicznych uzyskanych nanomateriałów znalazło się obrazowanie TEM i analiza HR-TEM, pomiary UV-Vis, FTIR, badania poświęcone fotostabilności i efektu fototermicznego, pomiary zeta potencjału i własności magnetycznych. Do badań biologicznych Doktorantka wykorzystwała trzy linie komórkowe: komórki raka wątrobowokomórkowego HepG2, komórki glejaka wielopostaciowego U-118 MG oraz komórki nienowotworowych ludzkich fibroblastów płucnych (MRC-5). Testy cytotoxiczności przeprowadzono z wykorzystaniem metod WST-1, MTT i LIVE/DEAD. Z kolei analiza zdolności uzyskanych nanomateriałów do dostarczenia DOXO przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Cytotoxiczność uzyskanych nanomateriałów oraz efektywność prowadzonej fototerapii badano także wykorzystując technikę cytometrii przepływowej analizując żywotność komórek, apoptozę i stres oksydacyjny. Spektrum zastosowanych w niniejszej pracy doktorskiej metod badawczych jest więc dość pokaźny.

W Rozdziale 3 Doktorantka przechodzi do prezentacji uzyskanych wyników. Doktorantka w pierwszej kolejności rozpoczyna od analizy własności fizykochemicznych niczym nie

powleczonych nanocząstek polidopaminy PDA. Warto tu zaznaczyć, że uzyskane przed Doktorantką nanocząstki polidopaminy o rozmiarach rzędu 100 nm nie wykazywały utraty właściwości fototermicznych podczas 5 kolejnych cykli naświetlania, a największy wzrost temperatury (aż o 47 °C) zaobserwowano przy stężeniu 100 mg/ml i mocy lasera 3W. Pomiar zeta potencjału wskazał ujemny ładunek, -30 mV, zgodny z wartościami raportowanymi w literaturze. Moje uwagi do tej części pracy są następujące. Na zamieszczonych widmach IR zależności transmitancji od liczby falowej brakuje skali (!) a w obszarze od około 1300-1100 cm^{-1} wycięto fragment widma (?) co jest sporym błędem, bo właśnie w tym obszarze Doktorantka wskazuje na obecność wiązań C-O od próbki. Niezrozumiałe jest również czemu na histogramach z HR-TEM dla nanocząstek zwłaszcza o największych rozmiarach (rys. 10. H) zamieszczono krzywą rozkładu normalnego. Z rysunku widać, że nie jest to rozkład normalny. Jeśli było to celowe, to może warto było przedyskutować ten wątek w pracy.

W kolejnym etapie Doktorantka dokonywała funkcjonalizacji nanocząstek polidopaminy wykorzystując w tym celu dendrymery PAMAM, do wnętrza których załadowano DOXO i przyczepiono fragmenty dsRNA. Wyniki monitorowano mierząc potencjał elektrokinetyczny otrzymanych materiałów. Wskazywał on na wysoki dodatni ładunek po pokryciu powierzchni nanocząstek PAMAM, jednak wraz z czasem, a także pH użytego medium ulegał on istotnym zmianom sugerującym zmniejszenie stabilności tak przygotowanych nanoukładów. Profil uwalniania DOXO z tego nanonośnika wykazał także zależność od pH, a największe uwalnianie zaobserwowano w roztworach buforowych, które imitowały kwasowy charakter organelli nowotworowych (po 24h przy pH=4.5 było to około 11%). Załadunek DOXO nie zmienił znacząco zeta potencjału, jednak podłączenie fragmentu dsRNA już tak. Badania cytotoksyczności nanonośników bez leku na liniach U118 i MRC-5 przy maksymalnym stężeniu do 9 mg/ml wykazały tylko nieznaczny spadek przeżywalności. Dodatkowe podłączenie jednostek dwuniciowego RNA do tak zbudowanych nanonośników skutkowało wyciszeniem ekspresji białka tensacyny C, nawet o 50%. Skuteczność chemioterapii z zastosowaniem DOXO uwalnianej z takiego multifunkcyjnego nanomateriału była testowana na linii U118 i okazała się być również zadowalająca nawet przy bardzo niskich stężeniach. Skojarzona z chemio- i geno- fototerapia (808 nm, 3W, 24h), wykazała systematyczny spadek przeżywalności komórek wraz ze zwiększeniem stężenia sfunkcjonalizowanego nanonośnika nawet do 20%.

Doktorantka do funkcjonalizacji używała dendrymerów trzeciej generacji, czy był jakiś konkretny powód wyboru akurat tej generacji dendrymerów? Czy należałoby się spodziewać czegoś innego, np. w kontekście stabilności, w przypadku dendrymerów wyższych generacji? Na stronie 71 wartość zeta potencjału dla PDS@DD wynosi +42 mV, a na stronie 75 już +44 mV. Która wartość jest ostateczna? Żywotność komórek U118 w zależności od stężenia przedstawiona na rysunku 23G zawiera dość spore słupki błędów (np. przy stężeniu 2.25 $\mu\text{g/ml}$ sięgającą nawet +/- 40%), jaka była tego przyczyna? Brak jest dyskusji błędu w pracy.

Kolejnym typem funkcjonalizacji rozpatrywanym w niniejszej pracy było pokrycie powierzchni nanocząstek polidopaminy tlenowodorotlenkiem żelaza(III) akaganéitem, celem wzmocnienia efektu fototermicznego. Wzrost kolczastych struktur żelaza $\beta\text{-FeOOH}$, na powierzchni nanocząstek został potwierdzony badaniami HR-TEM a temperaturowe zależności podatności magnetycznej (zarejestrowane techniką ZFC) wykazały, że przygotowane nanomateriały mają własności paramagnetyczne. Po przeprowadzeniu badań fototermicznych

Doktorantka zaobserwowała podniesienie temperatury medium (wody) o 5 stopni więcej w porównaniu z nanocząstkami polidopaminy bez pokrycia. Badania stabilności wskazały jednak utratę własności fototermicznych z każdym kolejnym cyklem. Cytotoksyczność nanocząstek PDA@ β -FeOOH była sprawdzana pod kątem ferroptozy i nie wykazała ona znaczących zmian w ilości żywych i martwych komórek HepG2. Podobnie, zresztą jak profile ROS, które były analizowane pod kątem generowania reaktywnych form tlenu przez nanocząsteczki pokryte strukturami żelaza. Doktorantka podsumowuje ten fragment badań stwierdzeniem, że konieczne jest wykonanie dodatkowych badań celem weryfikacji możliwości zainicjowania ferroptozy poprzez użycie nanocząstek PDA@ β -FeOOH jednak nie podaje w jaki sposób mogłaby to ostatecznie zweryfikować.

Moim zdaniem w pracy zabrakło odrębnego rysunku porównującego w sposób bezpośredni efekty temperaturowe uzyskane po naświetleniu r-r nanocząstek bez i z pokryciem β -FeOOH laserem o dł. fali 808 nm oraz mocy 2 W. Patrząc choćby na rys. 12D i 29D można odnieść wrażenie, że relatywny wzrost temperatury w pierwszym cyklu naświetlania dla nanocząstek PDA@ β -FeOOH jest o co najmniej 5 stopni niższy (a nie wyższy) niż ten uzyskany dla niepokrytych nanocząstek PDA. Jeśli badania były przeprowadzone w identycznych warunkach to czy nie powinno być na odwrót? W opisie pod rysunkiem 29 Doktorantka wspomina o panelach E i F, ale takich nie ma na rysunku (najprawdopodobniej chodziło o B i C). Na rysunku 31 C i D podane są skróty KN i KP bez podania do czego się one odnoszą. Wartość względną podaje się zawsze w odniesieniu do innej wartości. Wobec tego, względem czego była liczona względna produkcja ROS na rys. 31 A i C? (brakuje tej informacji przy opisie osi)

Końcowym etapem badań była synteza nanocząstek typu core-shell (rdzeń z kurkuminy, pokrycie z podipolaminy) oraz sprawdzenie ich skuteczności w łączonej terapii chemio- i fototerapii. Wyniki HR-TEM potwierdziły, że Doktorantce udało się rzeczywiście uzyskać nanocząstki o pożądanym rozmiarze (poniżej 100 nm) bez frakcji krystalicznej kurkuminy. Moje uwagi, jeśli chodzi o histogramy TEM i widma FTIR są dokładnie takie same jak wcześniej. Dystrybucja rozmiarów nanocząstek CUR@PDA (zwłaszcza powyżej 100 nm) nie ma charakteru rozkładu normalnego. Transmitancję na widma IR podajemy w procentach (!) i konieczne jest zamieszczenie na osi jakichkolwiek wartości, dopiero wtedy taka analiza ma jakikolwiek sens. Zamieszczenie na rysunku 35 widm IR dla nanocząstek PDA ułatwiło by Doktorantce dokładniejszą analizę układu charakterystycznych pasm w przypadku nanocząstek z kurkumina, CUR@PDA.

Uwalnianie kurkuminy z nanocząstek udało się potwierdzić z roztworu woda/etanol 1:1. Czy były próby sprawdzenia jak takie profile uwalniania mogłyby wyglądać w roztworach buforowych o pH = 4.5 oraz 5.5? Doktorantka podobnie jak wcześniej przeprowadziła badania fototermiczne i podaje, że wzrost temperatury medium z nanocząstkami CUR@PDA jest nawet wyższy niż dla nanocząstek niczym nieopłaszczonych polidopaminy, PDA. Przygotowanie odrębnego rysunku/rysunków porównujących efekty zauważone dla nanocząstek różnego typu nadałoby większej przejrzystości wynikom, zwłaszcza jeśli pomiary dla nanocząstek PDA i CUR@PDA były przeprowadzone w tych samych warunkach. Na rys. 39D wzrost temperatury w pierwszym cyklu naświetlania nawet nieco niższy niż ten zarejestrowany dla tego samego stężenia nanocząstek PDA zaprezentowany na rys. 12D, dlaczego?

Etap funkcjonalizacji nanocząstek CUR@PDA obejmował – analogicznie jak wcześniej – funkcjonalizację dendrymerami PAMAM trzeciej generacji w których ramionach „schowano”

DOXO, aby w ten sposób transportować ją do komórek. Profil uwalniania leku z nośnika CUR@PDA@DD był bardzo zbliżony do PDA@DD, mimo nieznacznie mniejszych wartości zeta potencjału dla nanocząstek zawierających hydrofobową kurkuminę. Badania cytotoksyczności potwierdziły również biokompatybilność nanocząstek CUR@PDA. Doktorantka potwierdziła również skuteczność chemioterapii z wykorzystaniem DOXO transportowanej do komórek z wykorzystaniem CUR@PDA@DD, chociaż jej efektywność była znacznie większa w przypadku linii U118 niż HepG2. Połączenie chemio i fototerapii dawało w tym przypadku jeszcze lepsze rezultaty, co potwierdza, że zsyntezowane przez Doktorantkę wielozadaniowe nanomateriały bazujące na polidopaminie mają rzeczywiście duży potencjał w skojarzonych terapiach przeciwnowotworowych.

W podsumowaniu, zamieszczonym na stronach 124-125, Doktorantka wypunktowała tylko najważniejsze wyniki przeprowadzonych przez siebie badań. W moim przekonaniu jest to niestety **najbardziej rozczarowujący element tej pracy. Od młodego badacza aspirującego o tytuł naukowy** doktora można bowiem wymagać czegoś więcej niż podania listy najważniejszych wyników, ale przede wszystkim syntetycznego podejścia do tematu i krytycznego odniesienia do literatury. Może warto było poświęcić chociaż parę zdań na dyskusję i analizę porównawczą uzyskanych wyników, choćby na temat tego która z zaproponowanych przez Doktorantkę modyfikacji nanocząstek polidopaminy okazała się być najbardziej obiecująca. Nanomateriały, w tym nanocząstki na bazie polidopaminy projektowane do terapii przeciwnowotworowych to tematyka która cieszy się ogromnym zainteresowaniem w środowisku badaczy na całym świecie. W czym zaprojektowane przez Doktorantki multifunkcyjne nośniki mogą okazać się lepsze, a w czym gorsze od innych? Podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza z pewnością nie wyczerpuje tematu, a wręcz przeciwnie otwiera nowe możliwości. Może warto było tutaj również wspomnieć o potencjalnych kierunkach przyszłych badań, które mogą bazować na tym co udało się zrobić do tej pory.

Rozprawa doktorska mgr Klaudii Żebrowskiej jest napisana w sposób staranny pod względem redakcyjnym, chociaż zdarzają się błędy redakcyjne i językowe (np. (g/ml zamiast µg/ml). Nie zaburzają one w żaden sposób odbioru pracy. Doktorantka świetnie posługuje się terminologią związaną z tematyką prowadzonych badań. Są to zagadnienia wysokospecjalistyczne i interdyscyplinarne, świadczące o dużej wiedzy z zakresu biologii molekularnej, fizyki i chemii.

Na zakończenie chciałabym podkreślić, że w pracy doktorskiej mgr Klaudii Żebrowskiej otrzymano bardzo ciekawe wyniki, istotne zarówno z punktu widzenia badań podstawowych, ale także potencjalnych zastosowań w terapii przeciwnowotworowej. Jako recenzent jestem zmuszona do zwrócenia uwagi na mankamenty pracy, ale w ogólnym ujęciu **pracę oceniam pozytywnie**.

Za najważniejsze osiągnięcia mgr Klaudii Żebrowskiej, przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej uważam

- syntezę i funkcjonalizację nietoksycznych i multifunkcyjnych nanocząstek na bazie polidopaminy z wykorzystaniem dentrymerów PAMAM G3, struktur żelaza β -FeOOH i kurkuminy,
- pokazanie, że nanocząstki PDA i CUR@PDA opłaszczane PAMAM idealnie nadają się jako nośniki DOXO do komórek nowotworowych,
- pokazanie, że wytworzone wielozadaniowe nanomateriały na bazie polidopaminy mogą być potencjalnie wykorzystane w celu stworzenia rutynowych i skutecznych terapii przeciwnowotworowych (łączona chemio-, geno- i fototerapia).



Rozprawa doktorska spełnia wymogi ustawy z dnia 20.07.2018 Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. W związku z powyższym **wniosuję do Rady Dyscyplin Nauki Fizyczne i Astronomia Wydziału Fizyki Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Klaudii Żebrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Adejaemiu Klaudie

