



Białystok, 27.03.2023 r.

dr hab. Barbara Leśniewska, prof. UwB
Zakład Analiz Farmaceutycznych i Żywności
Katedra Chemii Analitycznej i Nieorganicznej

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **Pana mgr. inż. Jacka Sikorskiego**

pt.: „**Platforma analityczna oparta na technikach spektroskopowych do charakteryzowania superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza(II, III) ukierunkowanych na transport do komórek nowotworowych**”

wykonanej w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego

Politechniki Warszawskiej

pod kierunkiem Pani dr. hab. inż. Magdaleny Matczuk

Choroby nowotworowe stanowią ciągle ogromne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Tylko wczesne wykrywanie nowotworów oraz zastosowanie nowoczesnych terapii może pozwolić na uratowanie zdrowia i życia wielu osób. Dlatego nadal prowadzone są badania nad opracowaniem nowych i czułych metod diagnostycznych oraz skutecznych celowanych terapii przeciwnowotworowych. Materiałami, które w ostatnich latach znajdują szerokie zastosowanie w tych obszarach medycyny są nanomateriały. Ich przykładem są superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (z *ang. superparamagnetic iron oxide nanoparticles*, SPIONs), które dzięki swoim specyficznym właściwościom takim jak duża stabilność, mała toksyczność, biokompatybilność, biodegradowalność mogą być wykorzystane w teranostyce - do jednoczesnej diagnozy i terapii przeciwnowotworowej. Niestety brakuje metod analitycznych do badania zachowania się takich nanomateriałów w warunkach fizjologicznych organizmu człowieka. Dlatego uważam, że tematyka badań podjęta przez Pana mgr. inż. Jacka Sikorskiego i przedstawiona w niniejszej rozprawie doktorskiej jest w pełni uzasadniona oraz wpisuje się w nurt poszukiwań odpowiednich narzędzi badawczych do oceny zachowania się superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza w organizmie człowieka.

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Jacka Sikorskiego liczy 130 stron. Układ pracy jest charakterystyczny dla rozpraw opartych na cyklu spójnych tematycznie publikacji. Pracę rozpoczyna streszczenie w języku polskim i angielskim, następnie jest spis treści, lista publikacji stanowiących podstawę dysertacji. Na kolejnych 18 stronach zamieszczono wstęp przedstawiający aktualny stan wiedzy w tematyce pracy, po którym sformułowano cel pracy. Następnie zamieszczono przewodnik po publikacjach (18 stron), wykaz publikacji razem z ich odpowiednimi kopiami (52 strony), oświadczenia współautorów oraz bibliografię. Praca przygotowana jest starannie, napisana poprawnym językiem naukowym. Wstęp zawiera 6 poglądowych rysunków, w większości z opublikowanych artykułów (za zgodą wydawnictwa), natomiast w rozdziale „Przewodnik po publikacjach” znajdują się rysunki



i tabele zaczerpnięte z publikacji Autora, jak również przygotowane wyłącznie na potrzeby złożonej dysertacji. Praca oparta jest na 137 pozycjach literaturowych, z których znaczna część została opublikowana w okresie ostatnich dziesięciu lat, co świadczy o aktualności podjętej przez Doktoranta tematyki badawczej.

Rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Jacka Sikorskiego ma formę spójnego tematycznie zbioru czterech artykułów opublikowanych w latach 2020-2022 w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Wszystkie prace znajdują się w czasopismach indeksowanych w bazie JCR (*Journal Citation Reports*) o sumarycznym współczynniku oddziaływania (*Impact Factor*; IF) wynoszącym 18,80. Są to prace opublikowane w *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2020, 412, 8145), *Applied Spectroscopy* (2021, 75, 1305), *International Journal of Molecular Science* (2022, 23, 1088) i *Molecules* (2022, 27, 8442). Prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej są wieloautorskie; pierwsze dwie prace liczą 4 autorów, trzecia - siedmiu, natomiast czwarta - trzech. Z załączonych oświadczeń wynika, że Pan mgr inż. Jacek Sikorski w przeważającym stopniu samodzielnie prowadził prace badawcze oraz dokonywał analizy i interpretacji wyników pod opieką merytoryczną i przy wsparciu Pani Promotor dr hab. inż. Magdaleny Matczuk. Należy podkreślić, że jest On pierwszym autorem w trzech pracach, co wskazuje jednoznacznie na Jego dominujący udział w przygotowaniu niniejszych opracowań, wypracowaniu koncepcji oraz realizacji zaplanowanych badań. Prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej zostały poddane wnikliwym i rygorystycznym recenzjom przez grono specjalistów z danej dziedziny oraz przez edytorów naukowych czasopism. Opublikowanie prac badawczych Doktoranta w wymienionych czasopismach świadczy o ich dużym znaczeniu i wysokiej jakości oraz o aktualności realizowanej tematyki.

Ocena merytoryczna pracy

We wstępie rozprawy doktorskiej Pan mgr inż. Jacek Sikorski przedstawił aktualny stan wiedzy dotyczący zastosowania superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (SPIONs) w medycynie, sposobów ich syntezy, modyfikacji i funkcjonalizacji. Omówił zjawisko powstawania tzw. korony białkowej na powierzchni nanocząstek, jej znaczenie dla transportu i oddziaływania sfunkcjonalizowanych nanocząstek z komórkami nowotworowymi oraz sposoby charakteryzowania oddziaływań SPIONs z białkami. Przedstawił również podstawy wybranych technik łączonych stosowanych do badania oddziaływań SPIONs z białkami.

Na tej podstawie Doktorant sformułował główny cel swojej pracy, którym było „opracowanie nowoczesnych metodyk analitycznych opartych na technikach spektroskopowych, które umożliwiłyby charakteryzowanie SPIONs o potencjalnych zastosowaniach teranostatycznych i badania ich oddziaływań z białkowymi składnikami surowicy krwi ludzkiej”. Postawione hipotezy badawcze były podejściem nowatorskim i bardzo ambitnym. Realizacja założonego celu wymagała ogólnej wiedzy chemicznej ze szczególnym uwzględnieniem zagadnień dotyczących właściwości SPIONs, metod ich syntezy i funkcjonalizacji oraz znajomości i charakterystyki wybranych metod spektroskopowych. Do realizacji postawionego celu Doktorant zaproponował wykorzystanie techniki łączonej elektroforezy kapilarnej z tandemową spektrometrią mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (CE-ICP-MS/MS), tandemowej spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej w trybie analizy pojedynczej cząstki (sp-ICP-MS/MS) oraz spektrofotometrii UV-VIS. Praca eksperymentalna wymagała od Doktoranta



umiejętności samodzielnego zaplanowania i wykonania badań, posługiwania się różnymi technikami instrumentalnymi oraz krytycznej oceny uzyskanych wyników. Rezultatem przeprowadzonych badań jest cykl czterech publikacji, które zostały omówione w kolejnym rozdziale zatytułowanym „Przewodnik po publikacjach”.

W pierwszej pracy (P1) Doktorant podjął badania nad opracowaniem metody CE-ICP-MS/MS oznaczania komercyjnie dostępnych SPIONs sfunkcjonalizowanych grupami karboksylowymi i aminowymi. Dokonał optymalizacji warunków oznaczania żelaza (odpowiadającego SPIONs) i siarki (odpowiadającej białkom surowicy) metodą ICP-MS/MS. Stwierdził, że zastosowanie tlenu w komorze reakcyjno-zderzeniowej pozwoliło na eliminację interferencji spektralnych podczas oznaczania żelaza i siarki w trybie pomiarowym z przesunięciem masy. Optymalizacja warunków rozdzielania elektroforetycznego SPIONs obejmowała m.in. wybór buforu, jego stężenia i pH, przyłożonego napięcia i objętości wprowadzanej próbki. Zauważono, że nanocząstki tlenku żelaza(II,III) sfunkcjonalizowane grupami aminowymi podczas 24 h inkubacji w symulowanych warunkach fizjologicznych (bufor fosforanowy z dodatkiem NaCl) ulegały rozpadowi, m.in. do formy jonowej żelaza (FeCl_2). Natomiast nanocząstki z grupami karboksylowymi charakteryzowały się dobrą trwałością w takich warunkach. Zastosowano więc je do zbadania oddziaływania z albuminą surowicy krwi. Uzyskane wyniki wskazują na powstawanie połączenia SPIONs z albuminą, które charakteryzowało się innym czasem migracji w stosunku do składników wyjściowych. Potwierdza to tworzenie się korony białkowej na powierzchni SPIONs. Zaletą opracowanej metody CE-ICP-MS/MS w porównaniu do metod chromatograficznych jest zastosowanie łagodnych warunków rozdzielania, bez stosowania rozpuszczalników organicznych. Zaproponowana metoda może zostać wykorzystane do badania oddziaływania innych nanoobjektów z surowicą krwi.

W drugiej pracy (P2) zsyntezowano SPIONs oraz SPIONs domieszkowane miedzią, jako przykład funkcjonalizacji powierzchni w stosunku do wybranych związków. Selektowność SPIONs domieszkowanych miedzią badano metodą spektrofotometryczną UV-VIS w stosunku do kuprizonu, związku tworzącego chelatowe połączenia z miedzią. Spadek stężenia analitu w roztworze po kontakcie z NP oraz brak charakterystycznego dla chelatu sygnału przy 600 nm wskazywał na trwałe wiązanie kuprizonu z powierzchnią domieszkowanych SPIONs. Zaobserwowano odwrotną liniową zależność pomiędzy absorbcją kuprizonu w roztworze a pewnym zakresem stężeń miedzi wprowadzonej w postaci domieszkowanych SPIONs. Na tej podstawie zaproponowano metodę spektrofotometryczną UV-VIS do oceny selektywności modyfikowanych nanocząstek w stosunku do wybranych analitów. Zgodnie z sugestią Doktoranta, jeśli związki wykazują charakterystyczne sygnały w zakresie UV-VIS, to zaproponowana metoda jest prostym i szybkim sposobem na potwierdzenie ich oddziaływania z powierzchnią nanocząstek poprzez obserwację spadku ich stężenia w roztworze.

Czytając publikację P2 zauważyłam pewne niezgodności w treści z rozprawą. W rozprawie podano, że „Pomimo wprowadzenia miedzi do struktury Fe_3O_4 , także właściwości magnetyczne otrzymanych SPIONs pogorszyły się jedynie w niewielkim stopniu - nanomateriał wciąż łatwo oddzielał się od roztworu z wykorzystaniem zewnętrznego pola magnetycznego, jednak w dłuższym czasie” (str. 43, wersy 25-28). Natomiast w publikacji podano (po tłumaczeniu na język polski), że „Czas reakcji NP na pole magnetyczne był



podobny dla NP domieszkowanych Cu i niedomieszkowanych NP (17 s). Ilość zastosowanej domieszki nie spowodowała pogorszenia właściwości magnetycznych” (str. 75, wersy 10-13, lewa kolumna tekstu). Podano również inne długości fali maksimum absorpcji kuprizonu: 263 nm w rozprawie (str. 43, wersy 30-33), natomiast w publikacji jest 250 nm (str. 75, wers 22, lewa kolumna tekstu, wersy 7, 11, 23 prawa kolumna tekstu). Proszę o wyjaśnienia rozbieżności.

W trzeciej pracy (P3) przedstawiono badania dotyczące oddziaływania zsyntezowanych nanocząstek tlenków żelaza(II,III) z białkami surowicy krwi z zastosowaniem tandemowej spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną w trybie analizy pojedynczej cząstki sp-ICP-MS/MS. W celu opracowania metody zoptymalizowano przepływ wodoru w komorze reakcyjno-zderzeniowej oraz wybrano palnik plazmowy o mniejszej średnicy rurki wtryskiwacza (1,5 mm). Parametry te pozwoliły na uzyskanie niskich granic wykrywalności rozmiarów (LOSD - *limit of size detection*) nanocząstek złota jako materiału odniesienia. Niestety nie zamieszczono wartości LOSD ani w publikacji, ani w rozprawie. Można się jedynie domyślać, że jest ona wyższa niż średnica zsyntezowanych SPIONs (16,68 nm, str. 46, wers 1-2). Metodę zastosowano do scharakteryzowania zsyntezowanych SPIONs, opisanych w pracy P2. Ze względu na tworzenie aglomeratów nanocząstek nie udało się określić rozmiaru otrzymanych SPIONs. Podjęto próbę zsyntezowania SPIONs o większych rozmiarach, jednak i w tym przypadku badania metodą sp-ICP-MS/MS nie pozwoliły na określenie rozmiarów cząstek. Pomocne w tym względzie okazało się obrazowanie techniką skaningowej transmisyjnej mikroskopii elektronowej w polu jasnym BF-STEM (rozmiary nanocząstek 8-16 nm). Zdecydowano więc o zastosowaniu opracowanej metody do badania stabilności SPIONs w obecności białek surowicy krwi. Wykorzystano tutaj właściwości nanocząstek do zatrzymywania białek na swojej powierzchni, co prowadzi do powstawania korony białkowej (jak wyjaśniono we wstępie). Wykazano, że na powierzchni SPIONs powstaje korona z białek surowicy krwi, która ogranicza powstawanie aglomeratów nanocząstek w znacznym stopniu w stosunku do roztworów wodnych SPIONs. Połączenia białek z nanocząstkami charakteryzowały się dobrą stabilnością, ponieważ nawet po oddzieleniu nadmiaru białek od nanocząstek przez ultrafiltrację nie zwiększył się stopień aglomeracji SPIONs. Zauważono, że albumina krwi wykazała słabszą zdolność do tworzenia korony białkowej niż białka surowicy krwi. Niestety, pomiędzy treścią rozprawy doktorskiej a publikacją jest rozbieżność dotycząca charakterystyki filtra zastosowanego do oddzielenia wolnych niezwiązanych białek od połączeń ze SPIONs. W rozprawie podano masę 100 kDa (str 46, wersy 18-19), natomiast w publikacji P3 jest wartość 10 kDa (str. 86, wersy 22-25). Moje pytanie jest zatem, jaki filtr zastosowano i dlaczego dokonano takiego wyboru?

Autor uważa, że zaproponowana metoda może zostać wykorzystana do szybkiego monitorowania zmian w strukturze SPIONs po oddziaływaniu z białkami surowicy. Moim zdaniem możliwa jest tylko obserwacja zmiany rozmiaru i dystrybucji nanocząstek na skutek powstawania korony białkowej.

W czwartej pracy (P4) ponownie zoptymalizowano metodę CE-ICP-MS/MS w celu jednoczesnego rozdzielania głównych białek surowicy: albuminy i transferyny. W optymalnych warunkach pomiarowych wyznaczono niektóre parametry analityczne opracowanej metody (P4 - Tabela 3). Komentarz do uzyskanych wyników zamieszczony na str. 41 (wersy 1-6 pod tabelą P4-2) zawiera pewne niezgodności. Autor podaje, że odtwarzalność



czasów migracji względem wszystkich reagentów wynosiła $\leq 8\%$ (str. 41, wers 4 pod tabelą P4-2), chociaż z danych w tabeli (P4 str.89, tabela 3) wynika, że jest to wartość $\leq 5.84\%$. Oprócz tego proszę o wyjaśnienie, czy RSD czasu migracji lub pola powierzchni wyznaczone dla pomiarów z różnych dni (inter-day) można określać jako odtwarzalność (str. 41, wersy 2-6 pod tabelą P4-2)? Trudności z analizą SPIONs (otrzymanych w pracy P-3) w obecności albuminy i transferyny skłoniły Doktoranta do zsyntezowania 5 nowych rodzajów nanocząstek modyfikowanych stabilizatorami ograniczającymi aglomerację. Analiza otrzymanych SPIONs metodą CE-ICP-MS/MS potwierdziła, że modyfikacje powierzchni nanocząstek wpływają na ich oddziaływanie z powierzchnią kapilary i parametry rozdzielania. Badania oddziaływania albuminy i transferyny z nowymi SPIONs nie dały zadowalających wyników. Doktorant wskazuje, że różnice we właściwościach magnetycznych nanocząstek komercyjnie dostępnych (słaby magnetyzm) i zsyntezowanych (silny magnetyzm) mogą być powodem ich odmiennego zachowania w kapilarze podczas rozdzielania elektroforetycznego.

W podsumowaniu Doktorant zamieścił najważniejsze odciążenia badawcze uzyskane w ramach rozprawy.

Opracowane przez Doktoranta procedury badawcze mogą znaleźć zastosowanie do:

- badania selektywności nanocząstek o modyfikowanej powierzchni w stosunku do wybranych związków - metoda spektrofotometryczna UV-VIS;
- badania stabilności i rozmiarów nanocząstek w obecności białek krwi - metoda sp-ICP-MS/MS;
- badania oddziaływania SPIONs z białkami - metoda CE-ICP-MS/MS.

Zaproponowane metody mogą być dobrym narzędziem badawczym do charakterystyki superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza(II, III) o potencjalnym zastosowaniu medycznym w diagnostyce i leczeniu nowotworów.

Inne uwagi krytyczne i dyskusyjne

Z obowiązku Recenzentki przedstawiam poniżej pewne niedociągnięcia w ocenianej rozprawie doktorskiej:

Str. 15 – niefortunne sformułowanie: spożywanie wyrobów tytoniowych,

Str.19 - powinno być „Rysunek 3” a nie „Rysunek 1”

Str. 33 – zamiast „służba zdrowia” powinno być „system ochrony zdrowia” (zgodnie z reformą z 1999 r.)

Str. 40 – brak wyjaśnienia nazw buforów HEPES i PIPES (wers 5), skrótu BGE (wers 9)

Str. 36 (wers 8 pod tabelą P1-1) i dalsze - nieprawidłowy sposób podawania stężeń jako mg Fe/mL zamiast mg/mL Fe

Str. 42 (wers 11) i dalsze - zapis wyników w formie „ $x \pm a$ ” bez wyjaśnienia znaczenia „a”.

Przedstawione przeze mnie uwagi nie mają wpływu na pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej.



UNIwersytet w Białymstoku

Wydział Chemii



15-245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1K, ☎ / fax (+48-85) 738-8052; e-mail: chemia@uwb.edu.pl

Wnioski

Jako Recenzentka mogę przyznać, że jestem pod wrażeniem wykonanej pracy, szczególnie w zakresie opracowania metody CE-ICP-MS/MS i badania oddziaływań SPIONs z białkami surowicy krwi ludzkiej, oraz solidności przedstawionych wyników. Uważam, że konstrukcja przedstawionej do recenzji pracy jest prawidłowa, hipotezy badawcze właściwie sformułowane, badania zaplanowane i przeprowadzone w sposób metodycznie poprawny. Uzyskane wyniki badań doprowadziły Doktoranta do poprawnych wniosków, a użyteczność opracowanych procedur analitycznych została potwierdzona praktycznie.

Oceniana rozprawa doktorska prezentuje wysoki poziom naukowy, potwierdza ogólną wiedzę chemiczną Doktoranta oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia przez Niego badań naukowych. Założony przez Panią Promotor i Doktoranta cel został osiągnięty. Praca stanowi wkład w rozwój chemii analitycznej, a opracowane metody stanowią nowe i oryginalne rozwiązania w analityce superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza(II, III) oddziałujących z białkami.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania merytoryczne i formalne określone w **art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r.** z późniejszymi zmianami i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Pana mgr. inż. Jacka Sikorskiego do dalszych etapów **postępowania** doktorskiego.

Barbara Desimierska